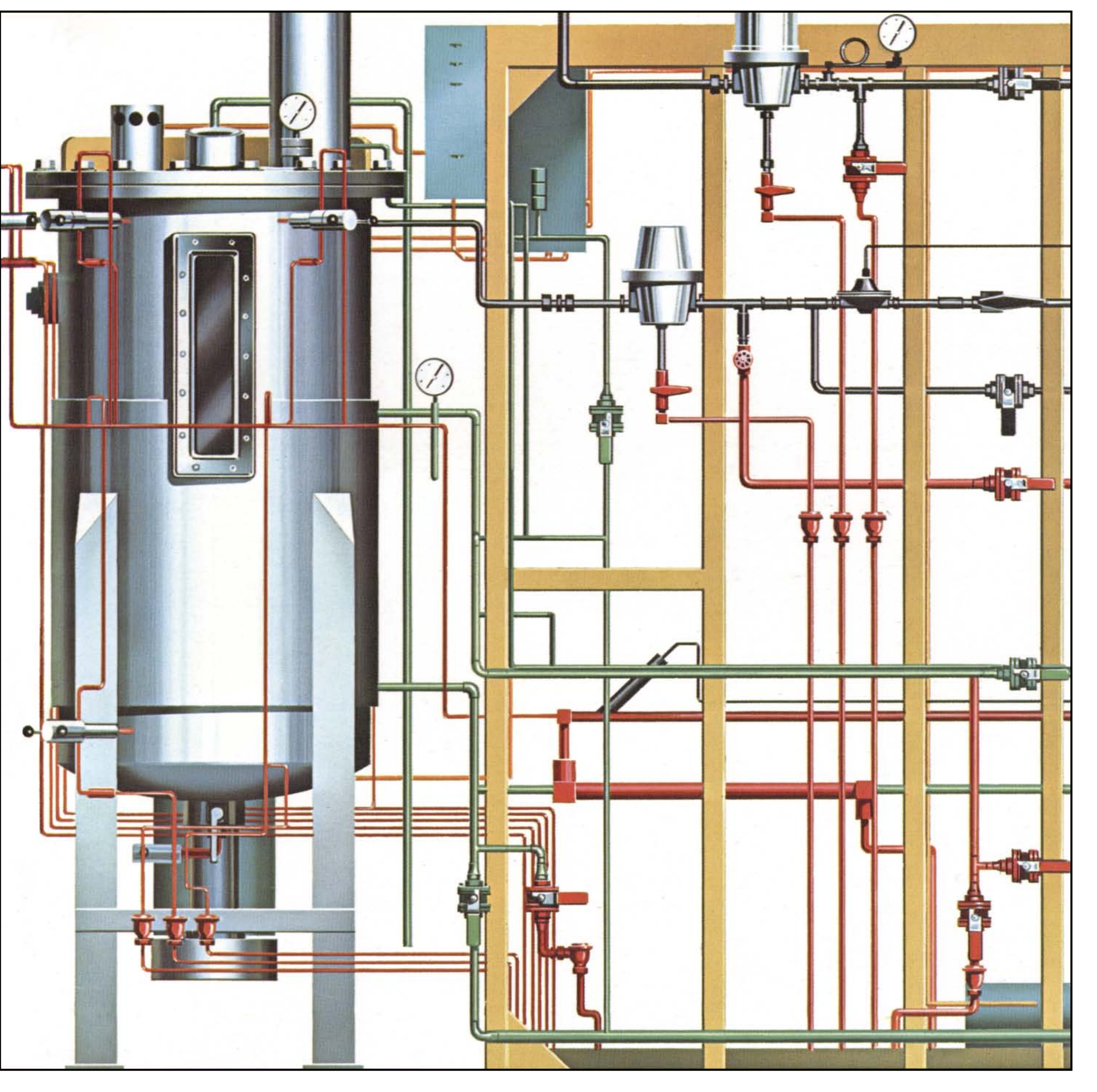
INVESTIGACION Y CIENCIA

Edición en español de SCIENTIFIC AMERICAN



MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Noviembre 1981

400 Ptas.

Los espacios en gris
corresponden a publicidad
en la edición impresa

Número 62
Noviembre 1981

INVESTIGACION Y
CIENCIA
Edición en español de SCIENTIFIC AMERICAN

Colaboradores de este número:

Asesoramiento y traducción:

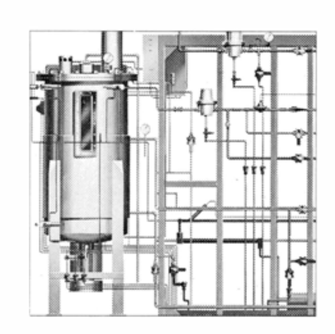
Paloma Liras: *Microbiología industrial*; Jorge Barbé García: *Microorganismos industriales*; Ricardo Guerrero: *Programación genética de microorganismos industriales*; E. Hernández Giménez: *Producción microbiológica de alimentos y bebidas*; José M. Argilés Huguet: *Producción microbiológica de fármacos*; J. Rodríguez Villanueva: *Elaboración microbiológica de productos químicos industriales*; Francisco Congregado Córdoba: *Métodos de producción en microbiología industrial*; C. Rodríguez Barrueco: *Microbiología agrícola*; Luis Bou: *Temas metamágicos*; José Vilardell: *Taller y laboratorio.*

Ciencia y sociedad:

Esteban Domingo y J. F. Martín

Libros:

J. Fernández Prida, E. Herrera, M. Artigas y Manuel G. Velarde



LA PORTADA

El dibujo de portada simboliza el tema de este volumen de INVESTIGACIÓN Y CIENCIA: la microbiología industrial. El tanque de la izquierda es un fermentador, recipiente donde se cultivan los microorganismos que sintetizan los productos de interés en microbiología industrial. El sistema de tuberías asociado con el recipiente satisface las exigencias de los organismos. Las tuberías rojas conducen vapor para esterilizar el conjunto y el medio de crecimiento antes de introducir un inóculo en el recipiente. Las tuberías verdes transportan agua fría o calentada con vapor para controlar la temperatura del cultivo. Las tuberías negras conducen el aire que necesita el organismo. (Algunas de las especies empleadas en microbiología industrial son anaerobias: se desarrollan en ausencia de aire y, por tanto, no lo necesitan.) Este fermentador lo fabrica la New Brunswick Scientific Co. Su capacidad es de 250 litros, adecuada para el trabajo en planta piloto. En la industria son frecuentes los fermentadores de 200.000 litros.

Suscripciones:
Prensa Científica, S. A.
Calabria, 235-239
Barcelona-29 (España)
Teléfono 322 05 51 ext. 41

Condiciones de suscripción:

España:
Un año (12 números): 3.300 pesetas

Extranjero:
Un año (12 números): 52 U.S. $

Ejemplar atrasado ordinario:
340 pesetas

Ejemplar atrasado extraordinario:
440 pesetas

Distribución para España

Distribuciones de Enlace, S. A.
Ausias March, 49, Barcelona-10

Distribución para los restantes países:

Editorial Labor, S. A.
Calabria, 235-239 - Barcelona-29

Publicidad:

Madrid:
Gustavo Martínez Ovin
Avda. de Moratalaz, 137, Madrid-30
Tel. 430 84 81

Cataluña:
Miguel Munill
Balmes, 191, 2.°, 2.ª, Barcelona-6
Tels. 218 44 45 y 218 40 86

Controlado
por O.J.D.



PROCEDENCIA DE LAS ILUSTRACIONES

Pintura de la portada de Ted Lodigensky

Página	Fuente	Página	Fuente
10	M. J. Vinkesteyn, Museo Nacional de Antigüedades, Leiden	57	Esteban Domingo y Miguel Alonso
12	Royal Society of London (*arriba*); Fundaciones Astor, Lenox y Tilden, Biblioteca Pública de Nueva York (*abajo*)	58	University of Cambridge, Department of Physics
13	Museo Pasteur, Instituto Pasteur, París	62	Juan F. Martín
14-15	H. Moor, Instituto Federal Suizo de Tecnología	66	Jon Brenneis
16	Chicago Aerial Survey	68	Alastair T. Pringle, Universidad de California en Los Angeles
18	Don Green, Kennecott	69-74	Jerome Kuhl
22	Herman J. Phaff, Universidad de California en Davis	75-76	Imperial Chemical Industries
24	Erika A. Hartwieg, MIT	78	Ralph Morse
25	Martin W. Miller, Universidad de California en Davis	80-90	Gabor Kiss
26-27	Tom Prentiss	94	Kyowa Hakko
28-32	Albert E. Miller	96-103	Albert E. Miller
33	Don Siegel, Universidad de Harvard, y Robert Fleischaker, MIT	106	Carl E. Shively, Universidad Alfred
34	Tom Prentiss	108-114	Andrew Christie
36	Albert E. Miller	118	B. Ben Bohlool, Universidad de Hawai
40	David A. Hopwood, John Innes Institute	120-122	Ilil Arbel
42-47	Bunji Tagawa	123	Donald H. Marx, Southeastern Forest Experimental Station
48	David A. Hopwood, John Innes Institute (*arriba*); Bunji Tagawa (*abajo*)	124-126	Ilil Arbel
49-52	Bunji Tagawa	128	Trevor V. Suslow y Douglas G. Garrott, Universidad de California en Berkeley
		131-133	David Vázquez
		134-142	David Vázquez y Miguel Alonso
		157	Jearl Walker
		158-164	Michael Goodman

ISSN 0210-136X
Dep. legal: B. 38.999-76
Fotocomposición Tecfa
Pedro IV, 160 - Barcelona-5
Fotocromos reproducidos por GINSA, S.A.
Imprime GRAFESA
Gráfica Elzeviriana, S. A.
Nápoles, 249 - Tel. 207 40 11
Barcelona-13
Printed in Spain - Impreso en España

Los autores

ARNOLD L. DEMAIN y NADINE A. SOLOMON ("Microbiología industrial") pertenecen al Instituto de Tecnología de Massachusetts. Demain, que enseña microbiología industrial en el departamento de nutrición y alimentos, se licenció en bacteriología por el Michigan State College (lo que hoy es la Universidad de dicho estado). Pasó luego a la Universidad de California, y estudió en sus dos sedes de Davis y Berkeley, doctorándose en microbiología en 1954. Antes de incorporarse al claustro del MIT, lo que hizo en 1969, dirigió el departamento de investigación de fermentaciones de los laboratorios Merck, Sharp & Dohme. Ha formado parte de numerosos comités relacionados con la microbiología aplicada y la tecnología de la fermentación. Solomon, investigadora asociada del departamento de nutrición y alimentos del MIT, se licenció por la Universidad de Massachusetts. Ha trabajado con el profesor Demain desde 1972 y, en los últimos años, ha colaborado con él en cierto número de artículos de su especialidad.

HERMAN J. PHAFF ("Microorganismos industriales") enseña ciencia y tecnología de los alimentos y bacteriología en la Universidad de California en Davis. De origen holandés, estudió la carrera de ingeniero químico en la Universidad Politécnica de Delft. En 1939 emigró a los Estados Unidos para continuar su formación, doctorándose en 1943 por la Universidad de California en Berkeley. Permaneció en Berkeley hasta 1951, año en que se trasladó a Davis. Es especialista en ecología y taxonomía molecular de levaduras y coautor (junto con Martin W. Miller y Emil M. Mrak) de *La vida de las levaduras*. Aparte de sus actividades profesionales, Phaff es un consumado violoncelista, y participa en muchos de los festivales musicales que se celebran en el campus de Davis.

DAVID A. HOPWOOD ("Programación genética de microorganismos industriales") ocupa la cátedra John Innes de genética de la Universidad de East Anglia. Dirige también el departamento de genética del cercano Instituto John Innes, un centro de investigación subvencionado por el Consejo de Investigación Agrícola Británico. Hopwood estudió biología, especializándose en botánica, en la Universidad de Cambridge. Poco después de su graduación, en 1954, escribe: "Comencé la investigación de mi doctorado en Cambridge estudiando la genética de *Streptomyces*, sobre la que se sabía muy poco en aquel tiempo. Sigo en el mismo tema; cada vez me fascina más". Se formó en las universidades de Cambridge y Glasgow, doctorándose por la última en 1974. Enseñó genética en Glasgow desde 1961 hasta 1968, cuando pasó a ocupar sus cargos actuales. En 1979, Hopwood fue elegido miembro de la Royal Society de Londres.

ANTHONY H. ROSE ("Producción microbiológica de alimentos y bebidas") es profesor de microbiología de la Universidad de Bath. Licenciado y doctor en bioquímica aplicada por la Universidad de Birmingham, ha trabajado en la Universidad Rutgers y en el National Research Council de Canadá en Ottawa. Ha dado clases en la Universidad Heriot-Watt de Edimburgo y en la Universidad de Newcastle en Tyne. En 1968 entró en el claustro de Bath. El tema central de sus investigaciones durante los últimos diez años ha versado sobre la composición y funcionamiento de la cubierta de *Saccharomyces cerevisiae* (la levadura de cervecería), tema del que ha publicado varios artículos en revistas especializadas.

YAIR AHARONOWITZ y GERALD COHEN ("Producción microbiológica de fármacos") desarrollan su actividad profesional en el campo de la microbiología en la Universidad de Tel Aviv. Aquí Aharonowitz obtuvo su título de doctor en 1974. Pasó luego dos años en el Instituto de Tecnología de Massachusetts "[Allí] trabajé con Arnold L. Demain, quien me introdujo en el mundo de la microbiología industrial. En su laboratorio estudié diferentes aspectos de la regulación metabólica de la producción de antibióticos beta-lactámicos en Estreptomicetes". Desde 1976 se halla en el departamento de microbiología de Tel Aviv. Además de sus aportaciones en el campo de los mecanismos de regulación genética y bioquímica, se interesa por ciertos aspectos de la aplicación industrial de los biocatalizadores. Cohen se licenció por el University College de Londres. Pasó luego un año entero trabajando en un kibbutz israelí. En 1968 se doctoró por el Instituto Weizmann de Ciencias en Rehovot, Israel. Ha trabajado en microbiología aplicada, especialmente en la posible explotación de los microorganismos para obtener cantidades útiles de vitaminas, aminoácidos y antibióticos.

DOUGLAS E. EVELEIGH ("Elaboración microbiológica de productos químicos") es profesor de microbiología del Cook College / New Jersey Agricultural Experiment Station, una división de la Universidad Rutgers (Estados Unidos). De origen inglés y formación asimismo británica se recibió de doctor por la Universidad de Exeter en 1959. Antes de incorporarse a la facultad de Rutgers, en 1970, trabajó durante seis años en el Prairie Regional Laboratory de Saskatoon, del Consejo Nacional de Investigaciones del Canadá. En sus horas libres, escribe Eveleigh, repone sus fuerzas practicando intensamente el ping-pong y los juegos de manos.

ELMER L. GADEN, JR. ("Métodos de producción en microbiología industrial") ocupa la cátedra Wills Johnson de ingeniería química en la Universidad de Virginia. Sus grados académicos se los expidió la Universidad de Columbia: licenciado en 1947 y doctor en 1949. Poco después de doctorarse se agregó a la plantilla de la facultad de Columbia, permaneciendo en ella hasta 1974, año en que fue nombrado decano de la Facultad de Ingeniería, Matemáticas y Ciencias de la Administración en la Universidad de Vermont. Accedió a su actual cargo en 1979. Su interés profesional se centra en el desarrollo de procesos bioquímicos para la fabricación de alimentos y productos químicos y para el aprovechamiento de residuos. Fue el primer galardonado con el Premio de Alimentación y Bioingeniería del Instituto Americano de Ingenieros Químicos, en 1970. En los últimos años, según él mismo dice, ha colaborado de forma particularmente activa en los trabajos de la Oficina de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Internacional de la Academia Nacional de

Ciencias/Consejo Nacional de Investigación.

WINSTON J. BRILL ("Microbiología agrícola") es profesor de investigación en bacteriología, de la cátedra Vilas de la Universidad de Wisconsin en Madison. Licenciado por la Universidad Rutgers se doctoró en microbiología por la de Illinois en Urbana-Champaign en 1965. Tras dos años de trabajo postdoctoral en el campo de la genética y regulación del metabolismo de aminoácidos, en el Instituto de Tecnología de Massachusetts, se trasladó a Wisconsin, donde centró su investigación en el estudio de la bioquímica, genética y fisiología de la fijación de nitrógeno [véase "Fijación biológica de nitrógeno" por Winston J. Brill: INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, mayo de 1977]. Además de su actividad académica, ha sido promovido al cargo de director de investigación de la Cetus Madison Corporation, empresa subsidiaria de la Cetus Corporation, recientemente creada para la aplicación a la agricultura de las modernas técnicas de la microbiología.

DAVID VAZQUEZ ("Inhibidores de biosíntesis de proteínas") nació en 1930. Se doctoró en farmacia (1957) y en ciencias químicas (1959) en la Universidad Complutense de Madrid. Realizó su formación postdoctoral en el Institut National Agronomique (París), National Institute for Research in Dairying (Reading, Inglaterra) y Department of Biochemistry y Medical Research Council Laboratory for Molecular Biology (Cambridge, Inglaterra), revalidando su título de doctor en la Universidad de Cambridge. Desde su regreso a España ha sido director del Instituto de Biología Celular (1968-1974) y del Instituto de Bioquímica de Macromoléculas (desde 1975) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Desde 1976, trabaja en el departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Consejero de Número del CSIC, miembro de la European Molecular Biology Organization (EMBO) y de la International Cell Research Organization (ICRO) y Académico Electo de Número de la Real Academia Española de Ciencias. Está a punto de aparecer el libro *Genética molecular bacteriana*, redactado por genéticos y microbiólogos y en el que el profesor Vázquez estudia las bases de la acción de los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas, en línea con el tema abordado aquí.

Hace...

José M.ª López Piñero

... cien años

Las teorías y las técnicas de la naciente microbiología eran ya aceptadas de modo casi general en los ambientes científicos españoles, en especial los relacionados con la medicina. Ello se manifiesta, por un lado, en la actividad desarrollada en 1881 por instituciones y particulares españoles para asimilar los avances europeos en este terreno y, por otro, en la aparición en la citada fecha de los primeros trabajos importantes de investigación bacteriológica realizados en nuestro país.

Hasta entonces, la información de las principales aportaciones extranjeras sobre la materia había sido bastante puntual y satisfactoria, sobre todo a partir de las primeras investigaciones de Pasteur acerca de la fermentación a finales de la década de los cincuenta. Las traducciones, los resúmenes, las revisiones y las noticias acerca de temas bacteriológicos habían ido cobrando cada vez mayor importancia. En 1881, entre los textos que aparecieron íntegramente traducidos en la prensa científica española figuran trabajos que hoy consideramos como clásicos, como el artículo de Carl Joseph Eberth en el que comunicó su descubrimiento de la *Salmonella typhi*, la ponencia de Joseph Lister en el Congreso Médico Internacional de Londres sobre la relación de los microorganismos y la inflamación y la comunicación sobre atenuación de los gérmenes presentada por Louis Pasteur ante la Academia de Ciencias de París.

La aceptación prácticamente generalizada de la nueva disciplina no impedía, sin embargo, que las posturas ante la misma variasen de acuerdo con la mentalidad científica. En los ambientes de ideología científica conservadora la actitud era claramente reticente, como se refleja en un editorial aparecido en la revista *El Siglo Médico* en abril de 1881: "Van extendiendo día por día los microbios su dominio, hasta el presente irresistible, por el campo de la patología; y es lo peor del caso que ni el diagnóstico, ni la terapéutica, ni tampoco la higiene, son deudores hasta hoy de notorias ventajas a las admirables investigaciones científicas que ocupan a varios sabios extranjeros... lo cual no quiere decir que dejen de rendir mayores provechos en adelante." La miopía de este pragmatismo de corto alcance, que defienden en cualquier época algunos grupos de profesionales de la medicina, resulta evidente en este caso porque en el mismo número de *El Siglo Médico* el principal artículo y una de las reseñas están dedicados al método antiséptico de Lister.

Muy distinta es la postura ante la microbiología que tenían los seguidores españoles de las corrientes experimentalistas y de la llamada "medicina de laboratorio", cuya preocupación fundamental era asimilar de modo riguroso y al día la avalancha de novedades. Como ejemplo de esta actitud puede recordarse la forma en la que el granadino Rafael Rodríguez Méndez, catedrático de higiene en Barcelona, informaba en la *Gaceta Médica Catalana* de mayo de 1881 de dos trabajos recientes de Pasteur: "Los notables experimentos de Pasteur han dejado fuera de duda: 1.º que el cólera de las gallinas es una enfermedad virulenta; 2.º que el virus contiene un parásito microscópico, que se puede cultivar fuera del organismo; 3.º que esta virulencia tiene diversas intensidades, desde la productora de la muerte hasta la que sólo determina ligeros trastornos; 4.º que estas diferencias se aprecian con la observación y con la experimentación; 5.º que el cólera de las gallinas no recidiva, y si lo hace, la energía del nuevo ataque está en razón inversa del anterior; 6.º que es posible obtener virus atenuado, que sirva de profiláctico como sirve la vacuna para la viruela; 7.º que, cultivado el parásito en caldo de músculos de gallina, el virus conserva toda su actividad si la *siembra* es reciente (8, 15, 30 días), pero que más allá de este plazo el virus se atenúa, y si la duración varía de tres a ocho meses la diferencia de poder virulento es muy notable.

"Este último hecho, la atenuación del virus, como efecto, debe reconocer una causa, que Pasteur se propuso investigar.

"Ante todo tuvo la idea de que, tratándose de un ser aerobio, y por tanto cultivado en contacto del aire, pudiera muy bien ser el oxígeno el agente productor de los cambios sufridos por el parásito para resultar menos enérgico, y en caso de no ser el oxígeno alguna otra de las sustancias atmosféricas.

"Si fuese el oxígeno, la demostración era bien sencilla, pues bastaría suprimir dicho gas en los experimentos. Con este objeto prepara caldo de pollo, lo siembra y lo guarda en tubos de cristal cerrados luego a la lámpara, dejando en ellos una cantidad variable de aire: un tercio, dos, etc. Mediante el oxígeno aprisionado, el virus empieza a desarrollarse y el líquido se enturbia; pero cuando se ha consumido el existente, el parásito se precipita y desaparece la turbidez, necesitándose dos o tres días para que se realicen todos estos actos. El líquido resultante, inoculado al cabo de un mes, de dos, tres, etc., hasta diez, es virulento en grado activo; en cambio el mantenido al descubierto, o está en este tiempo muerto el parásito o posee muy escasa potencia.

"Resulta de lo dicho que el oxígeno es el agente que debilita y aun extingue la energía del virus productor del cólera de las gallinas. Tal vez, como dice Pasteur, no se trata en este caso de un hecho aislado, sino del hallazgo de un principio aplicable a los virus en general, y que daría cuenta de la limitación de los estados epidémicos. Sea como quiera, el asunto le parece de suma importancia, y antes de sentar hipótesis, prefiere mantenerse en reserva, continuando sus interesantes investigaciones.

"Hace muy pocos días ha presentado Pasteur una nueva nota a la Academia de Ciencias, nota en que narra experimentos que tienden a probar el hecho inverso, o sea, la renovación de la primitiva energía de los virus, ya se encuentre ésta debilitada, ya se haya perdido. Sigámosle en sus ingeniosas e interesantes investigaciones.

"Obtenida una bacterídea carbuncosa, por ejemplo, que no tenga poder virulento para el carnero, el conejo y el conejillo de Indias, se le podrá volver su fuerza por lo que hace a estos animales. Hecho inactivo el microbo (*sic*) del cólera de las gallinas, ¿cómo se le rehabilita para producir la enfermedad en las gallináceas? Hoy el secreto está en las culturas sucesivas en el cuerpo de ciertos animales.

"La bacterídea carbuncosa, inofensiva para el conejillo de Indias, no es inerte en todas las edades: si se trata de un animal de muchos años, de un año, de seis meses, de un mes, de algunas semanas, de ocho días, de siete, de seis y aun de menos, no hay peligro de muerte, ni aun de enfermedad; si tiene un día, muere seguramente. Si entonces de este conejillo de un día, se pasa a otro el germen inoculando la sangre, luego a otro y así sucesivamente, se va despertando la virulencia hasta llegar a la actividad ordinaria, matándose entonces con el virus todos los conejillos,

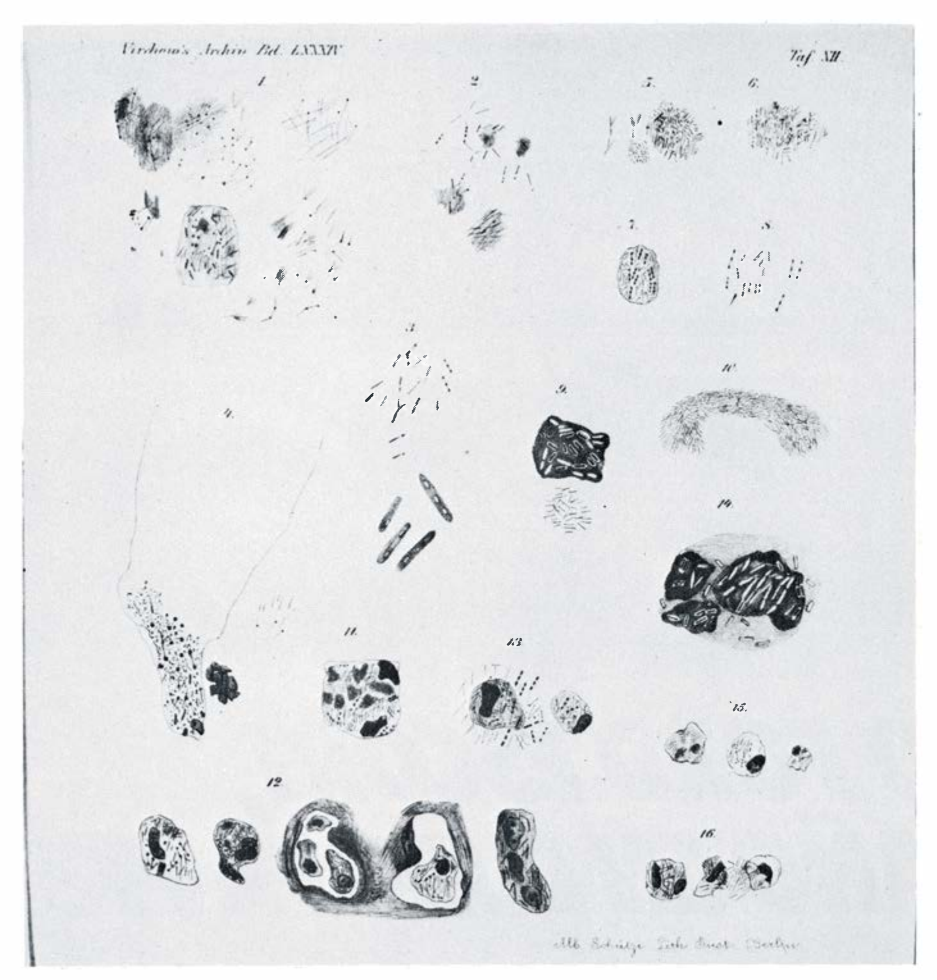


*Lámina que acompaña al artículo de Albert Neisser "Weitere Beiträge zur Aetiologie der Lepra" (***Arch. path. Anat. Phys., 84** *(1881), 514-542), en el que publicó los resultados de las investigaciones realizadas en Granada. "1, 2. Cultivo de serosidad de los tubérculos. - Esferococos. Células con acúmulos bacilares. Bacilos desarrollados. (Técnica con alcohol.) 3, 8. Bacilos con formaciones vacuolares (esquema). 4. Cultivo en cámara húmeda (formación de esferococos). 11, 13, 7, 15, 16. Células de los tubérculos con bacilos que aparecen en el interior de las células en parte aislados y en parte formando acúmulos asociados a la formación de vacuolas. 5, 6. Cultivos de sangre de los tubérculos. 10. Aglomeración bacilar en un cultivo de sangre de los tubérculos. 9, 14. Células y serosidad de los tubérculos con formación de vacuolas. (Técnica con agua.) 12. Células de las granulaciones de una herida producida tras la extirpación de una nudosidad leprosa."*

sea cualquiera su edad, y aun carneros, y quizás vacas y caballos. La virulencia persiste, si no se hace nada para atenuarla.

"En cuanto al microbo (*sic*) de las gallinas, una vez que se ha hecho infecundo, puede volvérsele potente obrando sobre pequeños pájaros, como canarios, etc. Mata estas especies desde la primera tentativa, y adquiere toda su fuerza por pasos sucesivos a través del cuerpo de estos animales.

"Pasteur añade que, dada esta energía progresiva, pueden obtenerse virus-vacunos de todas intensidades."

La introducción de la microbiología en España con anterioridad a 1881 no se había limitado a un proceso de asimilación meramente libresca. Algunos científicos y grupos aislados habían cultivado de modo práctico las técnicas de la nueva disciplina e intentado, incluso, algunas modestas investigaciones. Uno de los más tempranos fue el farmacéutico catalán Joaquín Balcells Pascual, generalmente recordado por su obra química. En la epidemia de 1854, Balcells describió el vibrión colérico de modo independiente y simultáneo con otros autores europeos, "multiple discovery" que no logró imponerse como lo haría el posterior de Koch. Más tarde, fueron también cultivadores ocasionales de la microbiología práctica el químico Ramón Torres Muñoz de Luna, el farmacéutico Juan Texidor y Cos, el zoólogo Laureano Arcas, el fisiólogo José Moreno Fernández, el dermatólogo José Eugenio de Olavide y el cirujano Federico Rubio Galí. Todos ellos fueron paladines en nuestro país del método experimental y de la investigación de laboratorio desde sus respectivas disciplinas y, por ello, no se limitaron a adquirir una información teórica. Ejemplos representativos de sus trabajos prácticos son las indagaciones de Torres Muñoz de Luna en torno a la rabia, a lo largo de los años setenta, y las de Rubio y Olavide "sobre el examen microscópico del vapor atmosférico de la enfermería del Dr. Martín de Pedro –otra figura de la "medicina de laboratorio"– en el Hospital General de Madrid" (1872).

En las fechas inmediatamente anteriores a 1881 habían iniciado su actividad otros científicos más jóvenes que mantendrían en el futuro una relación más continuada con la microbiología. Destacan, entre estos adelantados, los valencianos Pablo Colvée Roura y Vicente Peset Cervera, el granadino Eduardo García Solá y, sobre todo, el catalán Jaime Ferrán. En este contexto realizó sus estudios acerca de la lepra Benito Hernando Espinosa, catedrático en la Facultad de Medicina de Granada. El principal fruto de los mismos fue la publicación del libro titulado *De la lepra en Granada* (1881) que, además de exponer detalladamente la clínica de la afección, la estudia con amplitud desde los puntos de vista histopatológico y microbiológico. En lo referente a estos últimos, Hernando contó, en primer término, con la colaboración de García Solá, compañero suyo de claustro. En segundo lugar, la rareza de sus materiales y la seriedad de su labor le permitieron estar en relación directa con tres primeras figuras de la biomedicina europea de la época: Rudolf Virchow, André Victor Cornil y Albert Neisser.

El propio Hernando expuso dicha relación en los siguientes términos: "El Dr. Virchow llevó de esta Facultad fragmentos de órganos de elefancíacos y preparaciones macroscópicas a su laboratorio de Berlín, desde donde me ha indicado algunas ideas muy capitales, que me han servido de guía en el curso de estos trabajos.

"El Dr. Cornil estudia en París los órganos de lacerados que tomó de la colección de esta Escuela y los que sigo remitiéndole; y me comunica los resultados que obtiene, estableciendo de este modo un rápido comercio de ideas beneficioso para la enseñanza.

"El Dr. Neisser ha hecho en esta Facultad interesantes investigaciones sobre la bacteria de la lepra y continúa examinando en Leipzig el material que le envío siempre que se practica alguna autopsia."



Microbiología industrial

Introducción al tema de la fabricación de alimentos, bebidas y productos químicos, farmacéuticos y agrícolas por microorganismos, con especial referencia a los nuevos métodos que aporta la manipulación genética

Arnold L. Demain y Nadine A. Solomon

La microbiología industrial se encuentra en un estado de fermentación, un estado que, en una definición no técnica, caracterizaríamos como de agitación, turbulencia o inquietud general. Los recientes avances registrados en el campo de la biología molecular han creado un ambiente de ilusionada expectación en las posibles aplicaciones de las nuevas técnicas microbiológicas a un amplio espectro de procesos industriales. Pero se echa en falta, en las exposiciones públicas sobre el ADN recombinante, la ingeniería genética y cuestiones similares, un marco de referencia en cuyo contexto han de desarrollarse los nuevos avances. La microbiología industrial no es únicamente un campo explorado por la actividad empresarial; se trata también de un factor bien asentado en la economía mundial, responsable de una producción anual que hoy se valora en decenas de millones de dólares, por ceñirnos al ámbito norteamericano. Y es, además, el exponente de una intensa actividad humana cuya fecunda historia arranca de milenios atrás.

Este número de *Investigación y Ciencia* está dedicado a la microbiología industrial, con especial referencia a los cambios que en ella son de esperar como consecuencia de la introducción de las nuevas herramientas de la manipulación genética. Los artículos que siguen abordarán las principales subdivisiones del tema, colocando en cada caso los beneficios anticipados de la naciente biotecnología en su debida perspectiva histórica, económica y social. Hagamos primero un breve repaso de la situación general.

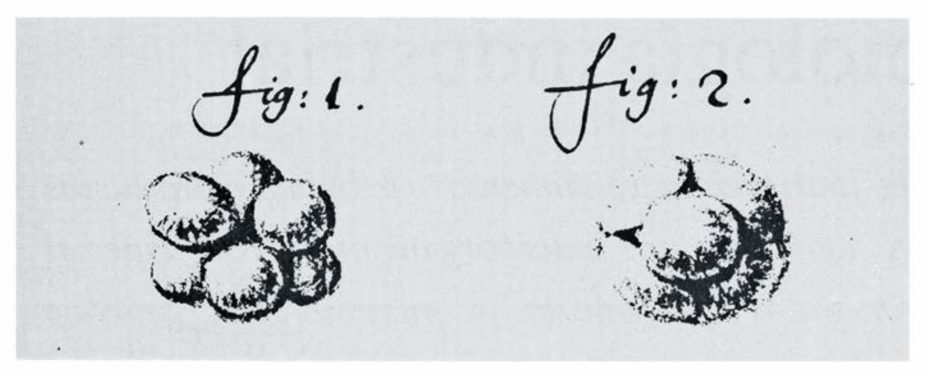
El arte de la fermentación, definido técnicamente en su sentido más amplio como la transformación química de compuestos orgánicos con la ayuda de enzimas (sobre todo los producidos por microorganismos), es muy antiguo. La capacidad de las levaduras para producir alcohol en forma de cerveza la conocían ya los sumerios y los babilonios, antes del año 6000 a. de C. Más tarde, aproximadamente hacia el año 4000 a. de C., los egipcios descubrieron que el dióxido de carbono generado por la acción de la levadura de cervecería podía fermentar el pan. Referencias al vino, otro antiguo producto de fermentación, se hallan en el Génesis, donde consta que Noé consumía algo más de lo debido.

Hacia el siglo XIV d. de C., la destilación de bebidas alcohólicas a partir de grano fermentado, práctica originaria, al parecer, de China o del Medio Oriente, era común en muchas zonas del mundo. Otros procesos de fermentación de antigua raigambre son: el cultivo de las bacterias del ácido acético para producir vinagre, de las bacterias lácticas para conservar la leche (por ejemplo en forma de yogur) y de distintas bacterias y hongos para fabricar quesos.

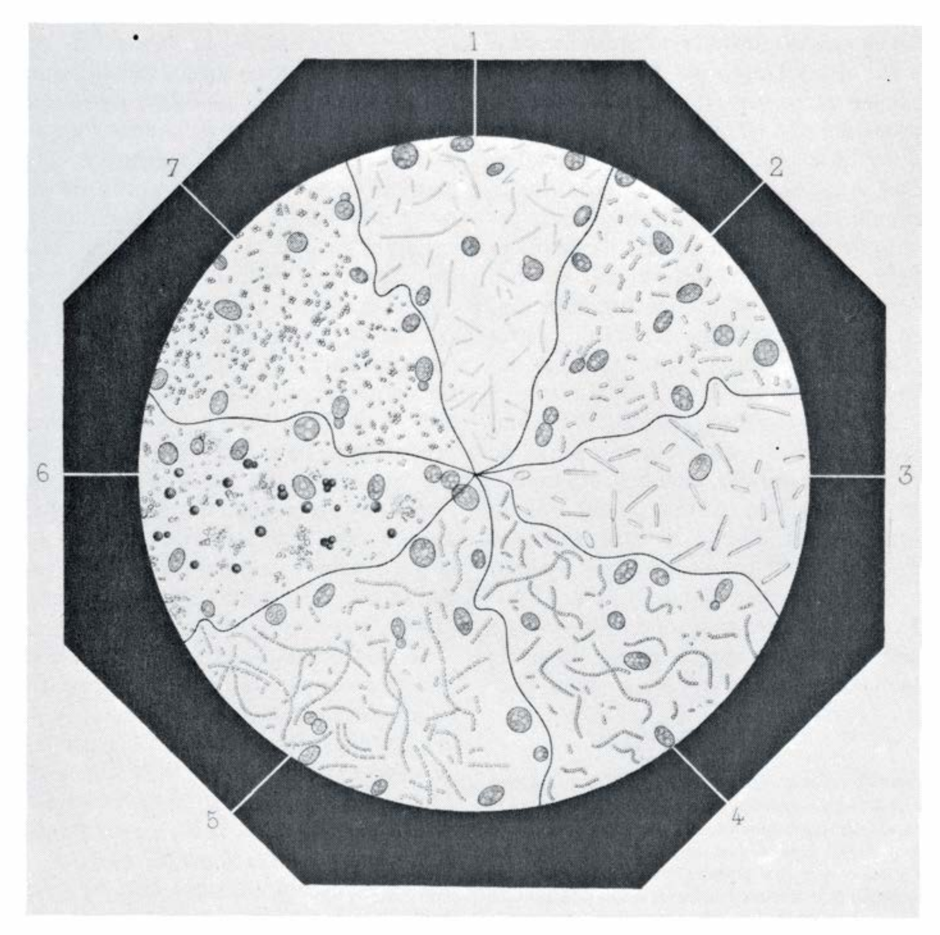
Los microorganismos proporcionaron alimentos y bebidas durante más de 8000 años, sin que se tuviera noción de su existencia. Hubo que esperar al siglo XVII, para que el holandés Anton van Leeuwenhoek, pionero de la microscopía, sirviéndose de una lente simple para el examen del agua, la materia orgánica en descomposición y los residuos de alimentos que se resistían entre sus dientes, describiera la presencia de "animálculos": organismos móviles que no llegaban ni a la milésima parte del tamaño de un grano de arena. Pensaron muchos que tales organismos surgían espontáneamente a partir de la materia inerte. Aunque la teoría de la generación espontánea, postulada, entre otros, por Aristóteles, estaba por aquel entonces desacreditada en su aplicación a formas superiores de vida, parecía explicar por qué un caldo vegetal claro se enturbiaba al envejecer: ello se debía al gran número de tales organismos. Pero hacia la segunda mitad del siglo XIX, Louis Pasteur, en Francia, y John Tyndall, en Inglaterra, demostraron la falsedad de la noción de la generación espontánea y probaron que la vida microbiana existente procedía de vida preexistente.

Se ha de puntualizar, sin embargo, que ya antes de que Pasteur se ocupara del origen de la vida microbiana, Charles Cagniard de la Tour, de Francia, Teodor Schwann y Friedrich Traugott Kützing, de Alemania, habían propuesto, cada uno por su lado, que los productos de la fermentación, principalmente el etanol (alcohol etílico) y el dióxido de carbono, resultaban de la actividad de una forma microscópica de seres vivos. Idea que rechazaron con acritud los más eminentes químicos de la época (Jöns Jakob Berzelius, Justus von Liebig y Friedrich Wöhler), quienes sostenían que la fermentación era estrictamente una reacción química.

ANTIGÜEDAD DE LA FERMENTACION, puesta de manifiesto en la representación gráfica de la fabricación de pan y de cerveza que recoge el relieve pintado de la página opuesta. Este relieve aparece sobre la pared de una tumba de la Quinta Dinastía egipcia, fechada aproximadamente hacia el 2400 a. de C. Se conserva en la colección del Museo Nacional de Antigüedades de Leiden. Las figuras del panel superior (*de derecha a izquierda*) se dedican a deshacer, aventar y moler el grano (presumiblemente cebada o una variedad primitiva de trigo). Las del panel intermedio empapan la harina molida en agua, dejando que algunos de los granos enteros produzcan malta, o germinen (*izquierda*), amasan la masa fermentada y la moldean en hogazas de varias formas (*centro*) y cuecen el "pan de cerveza" en un horno (*derecha*). El panadero se presenta en una actitud característica, rastrillando el fuego con un instrumento de mango largo sostenido con una mano y protegiéndose los ojos del calor con la otra. En el panel inferior se vierte la masa en un tanque de fermentación, apoyado en una tarima que recuerda una soga arrollada. Después de fermentar durante unos días, la cerveza terminada se vierte en jarras de cerámica, que rápidamente se tapan, se sellan con arcilla y se almacenan. Los cerveceros egipcios aprovechaban inicialmente levaduras del aire o que se hallaban sobre las pieles o cortezas de las frutas y cereales; más tarde dispusieron de una levadura pura o casi pura. La cervecería antigua producía varios tipos de cerveza; algunas clases, denominadas "fuertes", pudieron haber alcanzado un contenido en alcohol etílico de hasta el 12 por ciento.



PRIMER DIBUJO CONOCIDO de la estructura aparente de un grupo de células de levadura. Lo envió por carta Anton van Leeuwenhoek, en 1680, a Thomas Gale, secretario de la Royal Society de Londres. Examinando una muestra de cerveza fría a través de su primitivo microscopio, van Leeuwenhoek observó gran cantidad de pequeñas partículas. "Algunas de ellas", escribió más tarde (en latín), "me parecían bastante redondas, otras eran irregulares y algunas excedían a las otras en tamaño y parecían constar de dos, tres o cuatro de las partículas antes mencionadas, unidas entre sí. En fin, otras estaban formadas por seis glóbulos y estas últimas configuraban un glóbulo completo de levadura... Para representar visualmente esa combinación, tomé seis glóbulos de cera y los uní juntos, como en la figura 1, y los coloqué y dibujé de manera que los seis pudieran contemplarse a la vez. Estrujé a continuación los glóbulos en mis manos, a fin de que asumieran la forma mostrada en la figura 2, porque imagino que el resultado que yo obtenía al aplastar los glóbulos de cera en mis manos para comprimirlos era casi el mismo que en la fermentación de la cerveza". Aunque van Leeuwenhoek nunca logró distinguir las seis células que formaban el glóbulo mayor, describió que sus observaciones, interpretadas a la luz de sus modelos de cera, "eran tan claras para mí como si yo tuviera ante mis propios ojos una burbuja muy pequeña transparente que estuviera llena con otras seis más pequeñas". Lo que vio (a un aumento estimado en aproximadamente 125 diámetros) fue probablemente un agregado de células de levadura formado por rápida gemación.



MICROORGANISMOS responsables del deterioro de la cerveza, investigados por Louis Pasteur en su clásico estudio de la producción de cerveza en el siglo XIX. Esta composición de dibujos, que muestra los principales contaminantes microbianos de la cerveza y del caldo de malta, es reproducción de la edición original francesa de 1876 de su libro *Études sur la bière, ses maladies, causes qui les provoquent. Procédés pour la rendre inaltérable, avec une théorie nouvelle de la fermentation (Estudios sobre la cerveza, sus enfermedades y las causas que la provocan. Procedimientos para hacerla inalterable, con una nueva teoría de la fermentación).* A lo largo del desarrollo de este proyecto, Pasteur demostró la existencia de vida microbiana anaerobia, es decir, sin aire. Las partículas mayores y más globulares son levaduras.

Afirmaban éstos que la levadura del caldo de fermentación carecía de vida y no era más que materia orgánica en descomposición. La química orgánica estaba adquiriendo por entonces un gran auge y quienes se oponían a la hipótesis microbiana tuvieron inicialmente el santo de cara a la hora de hacer prevalecer sus puntos de vista.

Casi veinte años, desde 1857 hasta 1876, le costó a Pasteur probar la falsedad de la hipótesis química. Llamado por los destiladores de Lille para averiguar por qué el contenido de sus cubas de fermentación se agriaba, observó a través de su microscopio que el caldo de fermentación no sólo contenía células de levadura, sino también bacterias que producían ácido láctico. Su mayor contribución durante ese largo intervalo fue establecer que cada tipo de fermentación lo producía un microorganismo específico. Todavía más: en un estudio llevado a cabo para determinar por qué la cerveza francesa era inferior a la alemana, demostró la existencia de vida estrictamente anaerobia: vida en ausencia de aire.

Una de las ideas centrales de Pasteur, la de que cada fermentación suministra energía a la especie que la realiza, condujo al descubrimiento accidental del metabolismo acelular por el alemán Eduard Buchner, en 1897. Buchner encontró que un extracto de levaduras maceradas, liberado de las células intactas por filtración, retenía la capacidad de convertir el azúcar en alcohol. Su descubrimiento dio origen a la bioquímica. Trabajos posteriores mostraron que la conversión biológica consistía en una serie de reacciones enzimáticas sencillas, catalizada cada una de ellas por un enzima específico.

El progreso realizado en investigación bioquímica básica a partir del trabajo de Buchner fue considerable, pero no comenzó a aplicarse a la fermentación industrial hasta la primera guerra mundial. En el lado alemán, la obtención de glicerol para la fabricación de explosivos se convirtió pronto en una necesidad urgente. El bloqueo marítimo británico cortó la importación de aceites vegetales, la materia prima tradicional en la producción de glicerol. Pero algunos años antes, el bioquímico alemán Carl Neuberg había vuelto a considerar cierta observación de Pasteur: en la fermentación alcohólica se solían originar pequeñas cantidades de glicerol. Avanzando en su estudio, Neuberg descubrió que la adición de bisulfito sódico al tanque de fermentación favorecía la producción de glicerol

a expensas de la de alcohol. Aunque este descubrimiento prebélico sólo parecía tener interés académico, los alemanes lo desarrollaron rápidamente en una fermentación industrial que producía 1000 toneladas de glicerol al mes.

Los ingleses, por su parte, andaban escasos de acetona para la fabricación de municiones. Dificultad a la que salió al paso un químico de origen ruso, Chaim Weizmann, quien andando el tiempo se convertiría en el primer presidente de Israel. Weizmann desarrolló la fermentación butanol-acetona, que depende de la bacteria anaerobia *Clostridium acetobutylicum*. El proceso alemán de obtención de glicerol desapareció de la escena al final del conflicto. Destino que no sufrió el proceso butanol-acetona; éste persistió como fuente de acetona durante muchos años, hasta que lo desplazaron otros procesos que se fundaban en el petróleo. Fue la primera fermentación a gran escala en la que hubo que resolver problemas de contaminación por otras bacterias y bacteriófagos (virus que infectan bacterias). Por primera vez, se emplearon en fermentadores industriales los métodos de cultivo puro, un ensayo que resultaría de extraordinaria utilidad cuando llegó la era de los antibióticos, en la década de 1940.

Durante miles de años, la medicina popular venía aplicando queso, carne y pan mohosos para curar las heridas. Mas para observar directamente los efectos antagonistas de un microorganismo sobre otro, la humanidad tuvo que esperar a que lo hicieran Tyndall, Pasteur y William Roberts, un médico británico, en torno a 1870. Pasteur, con su característica clarividencia, sugirió que el fenómeno podía tener algún potencial terapéutico. A lo largo del medio siglo siguiente, se ensayó la capacidad curativa de diversas preparaciones microbiológicas, pero resultaron inactivas, cuando no demasiado tóxicas, en animales vivos. Finalmente, en 1928, Alexander Fleming observó que el hongo *Penicillium notatum* mataba sus cultivos de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La contaminación accidental de las placas de cultivo le permitió el descubrimiento. Tras desarrollar el hongo en medio líquido y separar el líquido de las células, encontró que el líquido celular podía inhibir el crecimiento de muchas especies bacterianas. Bautizó al ingrediente activo del líquido con el nombre de penicilina, pero abandonó pronto es nueva vía de investigación.

En la década de 1930, cierto número de químicos británicos intentaron aislar la penicilina. Mas la inestabilidad de la sustancia frustró sus esfuerzos. Por último, un estudio comenzado en 1939 en la Universidad de Oxford por Howard W. Florey, Ernst B. Chain y sus colaboradores condujo a la preparación con éxito de una forma estable de penicilina y a la demostración de su impresionante actividad antibacteriana, primero en cobayos y después en el hombre. Florey y su colega Norman Heatley consideraron que las condiciones de una Inglaterra en guerra no eran las adecuadas para el desarrollo de un proceso industrial de producción del antibiótico. Y así fue como se trasladaron a los Estados Unidos, en 1941, en busca de apoyo. Con la ayuda del Departamento de Agricultura y de varias compañías farmacéuticas, la producción de penicilina por un hongo emparentado, *P. chrysogenum*, se convirtió pronto en una realidad.

El advenimiento de la penicilina señaló el comienzo de la era de los antibióticos. Siguieron pronto los descubrimientos de Selman A. Waksman, edafólogo de la Universidad Rutgers, quien consiguió obtener numerosos antibióticos nuevos a partir de la clase de microorganismos denominados Actinomicetes; la más conocida de sus nuevas "drogas maravillosas" fue la estreptomicina. Desde entonces hasta ahora, la proliferación de productos y procesos de fermentación económicamente viables ha sido notable.



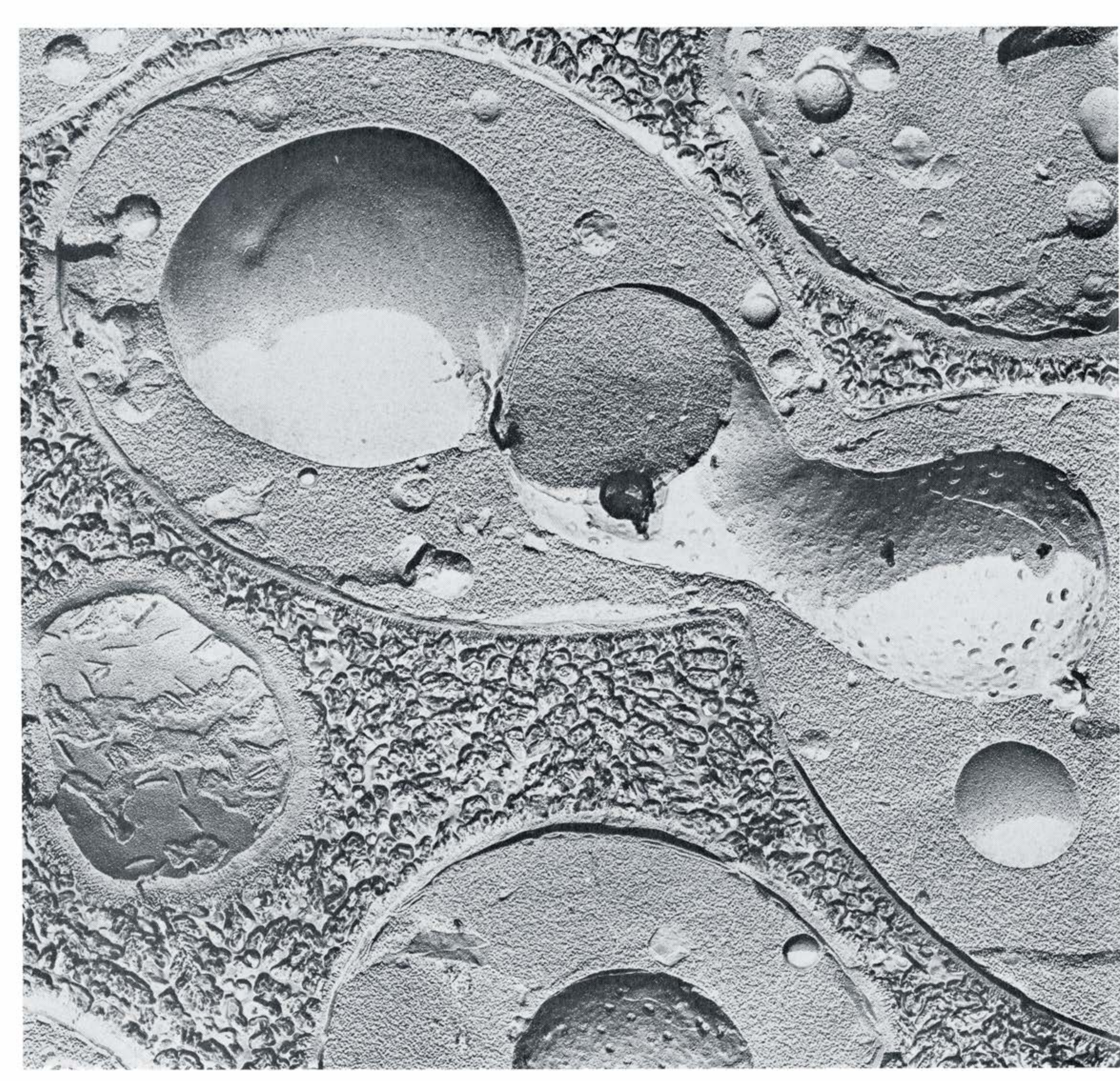
RETRATO DE LOUIS PASTEUR hecho en 1884 con ocasión de una visita a Copenhague. Pasteur tenía entonces 61 años. Murió, en Villeneuve-l'Étang, en 1895. La fotografía, tomada por J. Petersen & Son, se encuentra actualmente en los archivos del Museo Pasteur, una sección del Instituto Pasteur de París.

Subyacentes a la diversidad de productos y procesos microbianos que se describen en los artículos que seguirán, hallamos ciertas características que comparten todos los microorganismos; la más fundamental, el pequeño tamaño de la célula microbiana y su correspondientemente alta relación de superficie a volumen. Esta facilita el rápido

transporte de nutrientes al interior de la célula, y permite, por consiguiente, una elevada tasa metabólica. Así, la tasa de producción de proteína en las levaduras es varios órdenes de magnitud superior que en la planta de soja, que, a su vez, es 10 veces más alta que en el ganado. Esta velocidad de biosíntesis microbiana extremadamente alta permite que algunos microorganismos se reproduzcan en tan sólo 15 minutos.

Los ambientes capaces de albergar vida microbiana reflejan el amplio espectro de la evolución de estos organismos. Se han encontrado especies que viven a temperaturas comprendidas entre el punto de congelación del agua y casi el punto de ebullición, en agua salada y en agua dulce, en presencia y en ausencia de aire. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes: en forma de esporas permanecen inactivos durante años, hasta que el medio ambiente, más favorable, permita el desarrollo de las células.

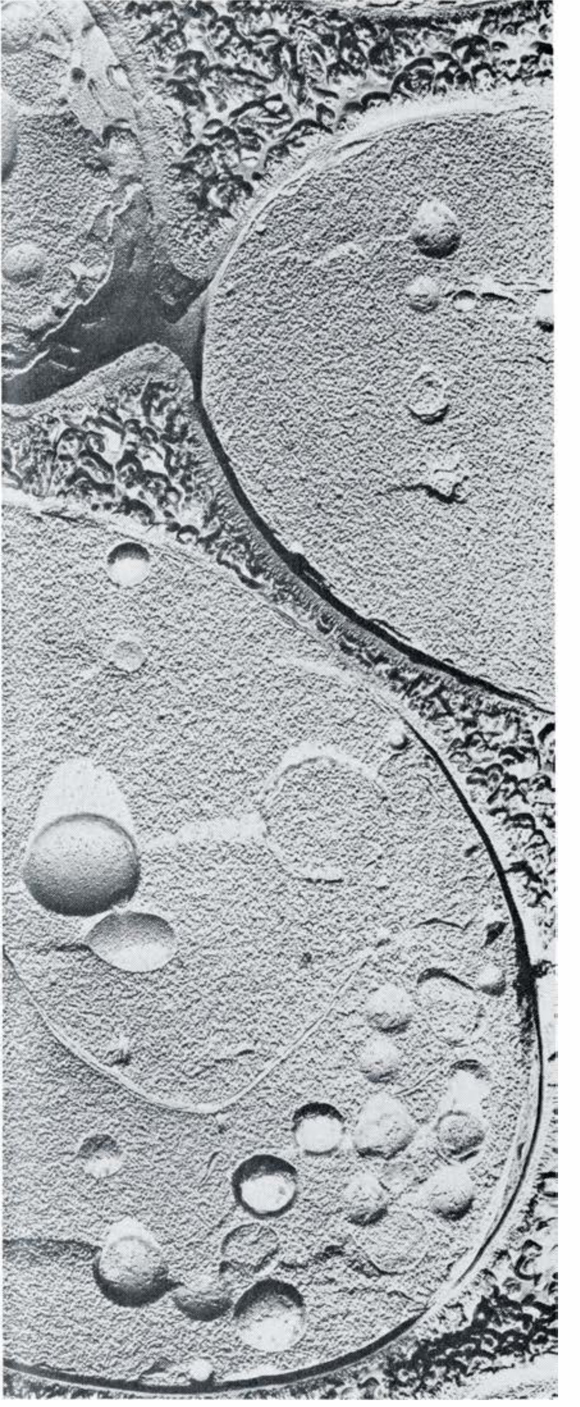
Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse, así, a muchas fuentes de nutrición. Versatilidad que hace posible el que las fermentaciones industriales se basen en nutrientes baratos. En este



CELULAS DE LEVADURA EN DIVISION, según aparecen en una micrografía electrónica obtenida por la técnica de criofractura. Las células pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cervecería). La muestra se congeló, primero, para fracturarla luego. Se eliminó después la matriz de hielo, dejando en relieve el material que se iba a replicar. (La micrografía electrónica se hace en realidad a partir de una réplica en película fina de la superficie.) La fractura desgarra las células, revelando su estructura interna. El área más pequeña en forma de pesas de gimnasio contenida en el área mayor, también en forma de pesas, es el núcleo en división de una de las células hijas. En la superficie de la membrana nuclear se aprecian los poros.

sentido, las melazas y el líquido de maceración del maíz, productos de desecho, respectivamente, de la cristalización del azúcar y de la molienda húmeda del maíz, resultan muy valiosos para la producción de penicilina.

Existen cuatro clases de microorganismos de interés industrial: levaduras, mohos, bacterias unicelulares y Actinomicetes. Las levaduras y los mohos son los más desarrollados; juntos constituyen los hongos. Se trata de organismos eucariotas: cuyas células, al igual que las de vegetales y animales, tienen un núcleo cerrado por una membrana y portan más de un cromosoma; contienen, además, orgánulos, tales como las mitocondrias (minúsculos elementos rechonchos, responsables del principal suministro energético de la célula). Las bacterias unicelulares y los Actinomicetes, por contra, son procariotas: carecen de membrana nuclear y mitocondrias; poseen un solo cromosoma. Además, las células de los procariotas son, por regla general, mucho menores que las de los eucariotas. A pesar de estas diferencias biológicas básicas, se advierte, sin embargo, una semejanza superficial entre los mohos y los Actinomicetes; unos y otros son filamentosos: crecen como un sistema ramificado de hifas filiformes, pero no a modo de células aisladas. Las levaduras y las bacterias, por otro lado, son unicelulares en condiciones normales.



Las otras formas visibles de la célula son vacuolas (cavidades esféricas) o mitocondrias (orgánulos celulares). La micrografía, que aumenta las células unos 21.000 diámetros, fue tomada por H. Moor, del Instituto Federal Helvético de Tecnología.

Los productos de interés comercial de estos microorganismos se encuadran en cuatro categorías principales: (1) las células microbianas propiamente dichas; (2) las macromoléculas que sintetizan, por ejemplo, enzimas; (3) los productos de su metabolismo primario (compuestos esenciales para su crecimiento) y (4) los productos de su metabolismo secundario (compuestos no esenciales para su desarrollo). En términos generales, los metabolitos primarios y los secundarios de interés comercial tienen un peso molecular bastante bajo (menos de 1500 dalton), si lo comparamos con el peso molecular de un enzima, que varía desde 10.000 hasta varios millones de dalton.

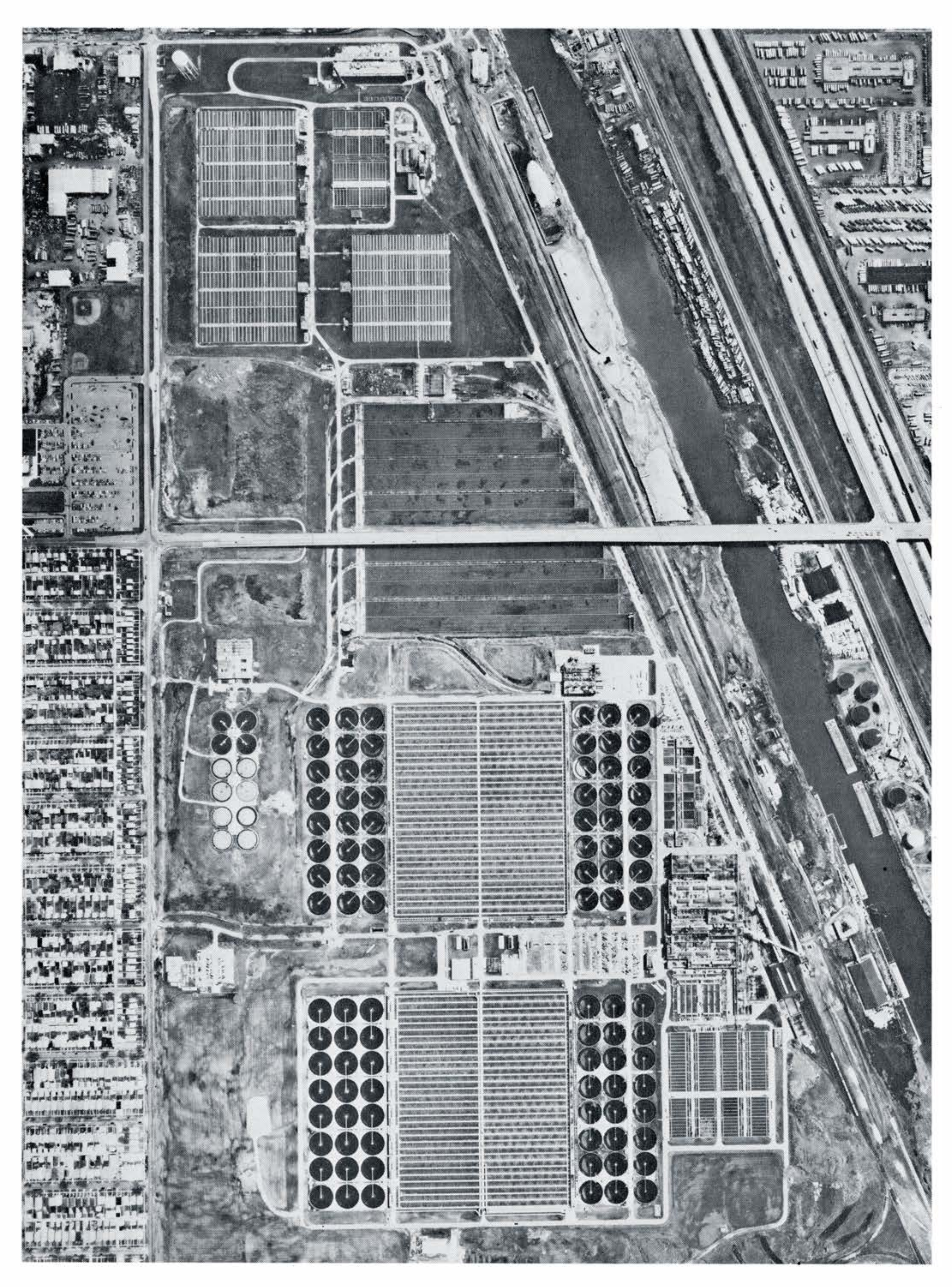
De entre las aplicaciones de índole comercial que poseen las células microbianas hay que destacar dos importantes. Tiene que ver la primera con el suministro de proteínas para alimentación animal, sobre todo. Aunque ese producto suele reconocerse por su forma más común de proteínas unicelulares, se refiere en realidad a la célula entera, cuyo componente principal es el proteico.

Se acude también a las células microbianas para llevar a cabo conversiones biológicas, a través de las cuales un compuesto se transforma en otro estructuralmente relacionado por intervención de uno o varios enzimas, aportados por las células. En las conversiones biológicas, también conocidas como transformaciones biológicas, pueden participar células en crecimiento, células sin crecimiento, esporas y hasta células desecadas. Los microorganismos, que pueden llevar a cabo casi todo tipo de reacción química, gozan de muchas ventajas frente a los reactivos químicos. A modo de ejemplo: muchas reacciones químicas no biológicas exigen un considerable aporte de energía para calentar o enfriar el tanque donde ocurre la reacción, suelen realizarse en solventes orgánicos y requieren catalizadores inorgánicos, que pueden contaminar el medio. Por último, de muchas reacciones químicas no biológicas resultan productos colaterales indeseados, que deben desecharse en una etapa posterior de purificación.

¿Qué decir de las conversiones biológicas? A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las reacciones químicas no biológicas, aquellas transcurren a temperaturas biológicas y emplean agua como solvente. A menudo, las células pueden inmovilizarse sobre una estructura soporte que viabilice un proceso continuo. Otra ventaja a reseñar es la especificidad de las conversiones biológicas: de ordinario, un enzima cataliza sólo una clase de reacción, en un lugar determinado de la molécula sustrato. El enzima puede también utilizarse para seleccionar un isómero, o forma molecular de un compuesto, de entre una mezcla de varios, y obtener así un isómero único del producto. Estas características dan cuenta de la alta producción típica de las conversiones biológicas, que pueden alcanzar rendimientos de hasta el 100 por ciento.

La conversión biológica de etanol en una solución diluida de ácido acético (vinagre) se realizaba ya en Babilonia 5000 años a. de C. Otras importantes conversiones biológicas transforman el isopropanol en acetona, la glucosa en ácido glucónico y el sorbitol en sorbosa. (La última reacción es la única etapa biológica en la fabricación, por lo demás abiológica, de ácido ascórbico, o vitamina C.) Entre las conversiones biológicas de interés sobresaliente para la industria farmacéutica vale citar las implicadas en la producción de esteroides. Más reciente es el éxito conseguido en el campo de la producción de penicilinas semisintéticas, donde se ha reemplazado una reacción química que contaminaba por una conversión biológica limpia.

Las más versátiles de las macromoléculas fabricadas por los microorganismos son los enzimas. La importancia de estos catalizadores biológicos en el sector alimentario y en la industria química estriba en su especificidad, rendimiento y potencia a unas condiciones de temperatura y acidez moderadas.



PROCESO DE TRATAMIENTO con lodos activados. Se emplea en él una población compleja de microorganismos para la detoxificación y degradación de aguas residuales y desechos industriales. En esta fotografía aérea, realizada desde una altura de aproximadamente 1600 metros, se aprecia una gran planta metropolitana de tratamiento de aguas residuales basada en este proceso. La estación se halla al sudoeste de Chicago. El norte queda a la izquierda.

Tradicionalmente, se han venido extrayendo a partir de vegetales y animales; pero su producción por microorganismos está registrando un avance muy rápido. Ello obedece a la asequibilidad, cada vez mayor, de tales organismos y a la facilidad de mejorar dicha producción enzimática por manipulación genética o de las condiciones del cultivo. Además, en la producción microbiana de enzimas, los tiempos de fermentación son cortos; los medios de crecimiento, baratos y los procedimientos de selección, sencillos.

Señalemos algunas aplicaciones recientes de enzimas producidos microbiológicamente: amilasas en cervecería, panificación e industria textil; proteasas en cervecería, ablandamiento de carnes, fabricación de detergentes y tratamiento del cuero; y renina, en la producción de quesos. Y destaquemos un avance contemporáneo: la combinación de tres enzimas de origen microbiano, α-amilasa, glucoamilasa y glucosa isomerasa, para obtener un agente edulcorante con alto contenido en fructosa a partir de almidón de maíz. Existe ya un gran interés y expectación por los enzimas inmovilizados sobre un substrato sólido, que ofrecen muchas ventajas sobre los enzimas libres.

En la biosíntesis enzimática es frecuente tener que explotar o eludir ciertos mecanismos reguladores que han ido evolucionando a lo largo de millones de años para impedir la superproducción de enzimas y sus productos. Aclaremos, en este sentido, que la producción de un enzima puede incrementarse en un factor de 1000 añadiendo una sustancia inductora especial al tanque de fermentación; el inductor puede ser el propio substrato sobre el que actúa el enzima o bien un compuesto estructuralmente análogo al substrato. La síntesis de un enzima está a veces reprimida por un mecanismo natural de retroacción (feedback) asociado con el producto final de la vía metabólica donde interviene el enzima. La represión puede soslayarse limitando la acumulación, en la célula, de ese producto final específico. Otro tipo importante de represión, la así llamada represión catabólica, se evita por sustitución de fuentes de carbono y nitrógeno de inmediato aprovechamiento (glucosa y amonio) con nutrientes que tardan más en consumirse; verbigracia: almidón y harina de soja.

No se agota en los enzimas la capacidad que presentan los microorganismos de crear macromoléculas que reporten un beneficio comercial. ¿Qué ocurre, por ejemplo, con los polisacáridos (moléculas de largas cadenas que constan de unidades de azúcar que se repiten)? Durante muchos años, la principal fuente de polisacáridos para la industria procedía de los vegetales, en particular de las algas marinas. Pero las cosas están cambiando y asistimos hoy a un renovado interés por los polisacáridos de origen microbiano. De los miles de polisacáridos diferentes que los microorganismos pueden producir, el mejor conocido es el xantano, fabricado por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Esta sustancia coloidal se añade a muchos alimentos como estabilizador y agente espesante; y la propia industria del petróleo lo está empezando a incluir entre los ingredientes de los lodos de perforación. La reseña de productos microbianos no acaba aquí. Otras macromoléculas de pareja factura biológica son los componentes activos de vacunas e insecticidas.

Para producir, por fermentación y a escala industrial, metabolitos primarios hay que eludir los mecanismos reguladores que gobiernan la síntesis de enzimas y su actividad en microorganismos. Estos mecanismos evolucionaron hacia la regulación de las reacciones enzimáticas, ya que suele resultar dañina para un organismo la producción en demasía de sus metabolitos internos. Y si lo hace, los verterá al medio para consumo de otros microorganismos. *Coeteris paribus*, el microorganismo superproductor se hallará en desventaja competitiva y acabará por morir. Pero no todos los demás factores son siempre iguales en la naturaleza; y así algunos microorganismos consiguen sobrevivir en su nicho ecológico, aun cuando su metabolismo está, en cierto modo, menos regulado que el de otros microorganismos. Los microbiólogos buscan con gran interés estas cepas peor reguladas en los programas de selección a gran escala. Cuando un microorganismo ligeramente mal regulado llega al laboratorio, el biólogo se apresta a explotar o desviar los controles reguladores naturales manipulando la nutrición o la genética del cultivo.

Entre los metabolitos primarios más importantes que comercializa la industria de la fermentación deben citarse aminoácidos, nucleótidos purínicos, vitaminas y ácidos orgánicos. Valga de ejemplo el ácido cítrico, producido por hongos bajo determinadas condiciones en las que se ha creado un desequilibrio nutricional al limitar el suministro de ciertos minerales, como hierro o manganeso. En la mayoría de los procesos industriales se combina la manipulación genética con la del medio para así obtener el máximo rendimiento en la síntesis del metabolito. Recordemos a este propósito cómo el hongo *Ashbya gossypii* multiplicó por 20.000 la producción de riboflavina (vitamina B_2) y, por 50.000, lo hicieron las bacterias *Propionibacterium shermanii* y *Pseudomonas denitrificans* para el caso de la cobalamina (vitamina B_{12}).

De todos los productos tradicionales obtenidos por fermentación, los más importantes para la salud humana son los metabolitos secundarios. Donde se incluyen, además de los antibióticos, ciertas toxinas, alcaloides y factores de crecimiento vegetal. Varían ampliamente en su estructura; producido cada uno de ellos por una especie microbiana distinta o por un pequeño grupo de especies, se forman, frecuentemente, a modo de mezcla de sustancias muy relacionadas entre sí. En estado natural, sus funciones se hallan ordenadas a la supervivencia de la especie, pero cuando los microorganismos que las producen se desarrollan en cultivo puro, los metabolitos secundarios no desempeñan esa misión.

Los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos, de los que se han descubierto más de 5000, cifra que aumenta a razón de una media aproximada de 300 por año. Aunque la mayoría carecen de utilidad: son tóxicos para los organismos vivos, cuando no inoperantes. Por algún motivo que se desconoce, los Actinomicetes se muestran asombrosamente prolíficos en el número de antibióticos que pueden excretar. Aproximadamente el 75 por ciento de todos los antibióticos se obtienen de estos procariotas filamentosos, y ese mismo valor porcentual corresponde al número de actinomicetes pertenecientes a un mismo género: *Streptomyces*.

A pesar de la extensa gama de antibióticos conocidos prosigue la búsqueda de otros nuevos, necesarios para combatir a los organismos naturalmente resistentes y a los que han adquirido resistencia por mutación de su forma. Nuevos antibióticos que se necesitan también para suministrar drogas más inocuas. Los químicos se ocupan de modificar las estructuras descubiertas por los microbiólogos. Tales antibióticos semisintéticos han adquirido ya cierta importancia en la práctica clínica. Pero no circunscriben su aplicación a la quimioterapia humana y animal; se les destina también a promover el desarrollo de animales de granja y proteger las plantas contra el ataque de microorganismos dañinos.

El arma principal de que se vale la industria de la fermentación para com-



LAS BACTERIAS SE EXPLOTAN en gran escala para la extracción de ciertos metales a partir de menas de pobre concentración. Las dos fotografías, por ejemplo, muestran procesos de lixiviación bacteriana en dos grandes minas de cobre a cielo abierto en el sudoeste de los Estados Unidos. La fotografía aérea de la parte superior ofrece una vista general de una explotación minera en Santa Rita, Nuevo México; la mina propiamente dicha se encuentra en la parte posterior, y los depósitos de lixiviación asociados están en la parte anterior derecha. La fotografía inferior es una vista detallada de un depósito de lixiviación de una mina similar en el Bingham Canyon, Utah; puede verse que la solución de lixiviación se está reciclando por medio de una serie de aspersores giratorios. Las bacterias, pertenecientes sobre todo al género *Thiobacillus*, intervienen en la lixiviación convirtiendo el hierro, de distintos compuestos, desde su forma ferrosa a la férrica. El ion férrico, un muy eficaz agente oxidante, lleva a cabo dos funciones útiles: oxida la pirita para dar ácido sulfúrico, lo que mantiene la alta acidez de la solución lixiviadora, y oxida los sulfuros minerales insolubles que contienen cobre en sulfato de cobre soluble, que emigra en solución hasta el fondo del depósito, donde se colecta en estanques de recogida. La solución se bombea periódicamente hasta los puestos de recuperación del cobre. En la operación de lixiviación participa un número ingente de bacterias, en algunos lugares hasta un millón por gramo de mena.

petir, en rendimiento, con la industria química no biológica es la mutación. El biólogo puede tratar un organismo con un agente mutagénico que aumente la frecuencia de cambios en los genes de las células en varios órdenes de magnitud. Aunque las modificaciones genéticas que tienen lugar suelen ser perjudiciales para el microorganismo, a veces resultan provechosas para el hombre. Para identificar esos cambios (verbigracia, un aumento en la producción de antibiótico), el microbiólogo recurre a unos procedimientos adecuados de selección y, así, mantener por siempre la modificación deseada. Muestra de esa metodología es el caso de las actuales cepas industriales de *Penicillium chrysogenum*: producen 10.000 veces más penicilina por unidad de volumen de caldo que la cepa original de Fleming.

Además, los mutantes producen de vez en cuando antibióticos modificados, dotados de mejores propiedades. Aunque se trata de un fenómeno esporádico y fortuito, los biólogos acaban de desarrollar una técnica, denominada biosíntesis mutacional, que permite diseñar nuevos antibióticos de una forma más racional.

Aunque el balance del enfoque mutagénico en la industria resulta positivo, hay que reconocer que constituye un procedimiento lento y laborioso. En los últimos años, hemos asistido a un avance rápido y espectacular de la genética microbiana; progreso que ha cristalizado en un conjunto, enteramente nuevo, de opciones y posibilidades para la industria de la fermentación. Nos referimos, entre otras, a la fusión de protoplastos, multiplicación (amplificación) de genes y técnicas de recombinación del ADN. En la naturaleza, los cambios genéticos surgen por mutación y, también, por recombinación genética entre dos células de distinto tipo genético, produciéndose progenies con genes de uno y otro progenitor. Hasta hace poco, apenas si había hecho la industria uso de ese fenómeno; lo que se justifica por la frecuencia, extremadamente baja, con que se presenta recombinación genética en las cepas industriales de microorganismos. Pensemos, por ejemplo, que el entrecruzamiento de dos cepas de la misma especie de *Streptomyces* genera sólo una célula recombinante por cada millón de células no recombinantes.

En la nueva técnica de fusión de protoplastos, sin embargo, se eliminan las paredes celulares de cada tipo, se mezclan los protoplastos resultantes y se permite que el producto de fusión regenere su pared celular. Este procedimiento conduce a un extraordinario aumento de la frecuencia de recombinación genética, hasta el punto de que muchas especies de *Streptomyces*, tras cruzarse, manifiestan un recombinante por cada cinco células. El aumento en la frecuencia de recombinación permite también detectar recombinación genética entre diferentes especies. La fusión de protoplastos se está explotando ahora para recombinar mutantes de crecimiento lento, pero de alta producción, con sus antecesores de crecimiento rápido, a fin de producir cepas de crecimiento rápido y de alta producción; también se utiliza para recombinar varios mutantes muy productivos, procedentes de uno o más tratamientos mutagénicos, al objeto de producir combinaciones aditivas, o incluso sinergísticas entre mutaciones que muestran un mayor rendimiento. La fusión de protoplastos es recurso válido también para producir nuevos antibióticos híbridos por conjugación de cepas estrechamente relacionadas que fabrican antibióticos distintos.

Ehicimos mención de la multiplicación génica. Se trata de una forma de manipulación extremadamente poderosa y de gran virtualidad en el futuro industrial de la microbiología. En esta técnica, los genes se amplifican, o duplican, forzando a los plásmidos que los contienen a reproducirse rápidamente. (Los plásmidos son pequeños segmentos circulares de ADN extracromosómico que portan desde un mínimo de dos genes hasta un máximo de 250. Pueden existir autónomamente en el citoplasma de una célula o formar parte integral del cromosoma.) En su estado autónomo, los plásmidos suelen reproducirse a la misma velocidad o a una velocidad algo superior que el cromosoma. Aunque hay normalmente entre 2 y 30 copias de un plásmido por célula, podemos inducirles a reproducirse mucho más deprisa que el ADN cromosómico, produciéndose hasta 3000 copias de un plásmido por célula.

La técnica de multiplicación génica se ha ensayado por extenso en varias bacterias, siendo *Escherichia coli* una de ellas. En principio, podemos transferir ya cualquier gen cromosómico (o conjunto de genes) a un plásmido y amplificar el gen, incrementando hasta niveles muy altos la producción de la proteína codificada por el gen. Casi todas las especies bacterianas contienen plásmidos, al igual que ciertos eucariotas, como las levaduras. Hemos de señalar la gran importancia que, para la industria de la fermentación, reviste el hecho de que casi todas las especies productoras de antibióticos alberguen plásmidos que incorporan genes estructurales para la fabricación del antibiótico o genes que regulan la expresión de los genes estructurales.

Pero no sólo los plásmidos. También los bacteriófagos pueden transferir y multiplicar genes. Nuevos procesos para la fabricación de enzimas y metabolitos primarios resultarán, probablemente, de la introducción de técnicas de amplificación genética, pues muchos de los enzimas que codifican para los genes estructurales de la biosíntesis de metabolitos primarios están agrupados en los cromosomas de la bacteria. La transferencia de estos "operones" al ADN de plásmidos o bacteriófagos, seguida de la multiplicación genética, podrá producir nuevos microorganismos.

Los éxitos de la recombinación artificial del ADN, coreados a bombo y platillo, habrán de ejercer un poderoso influjo sobre la microbiología industrial a lo largo de los próximos diez años. La recombinación genética aumenta la diversidad de los microorganismos; agrupa información genética para formar nuevas combinaciones estables y crear así nuevos genotipos. En la naturaleza, la recombinación genética se da entre organismos de la misma especie o de especies estrechamente emparentadas. Todos los organismos disponen de enzimas, conocidos como endonucleasas de restricción, que reconocen el ADN extraño y lo destruyen para que no haya "recombinación ilícita". En 1973 se descubrió que podían cortarse moléculas de ADN con enzimas de restricción, reunir las piezas del ADN con otro enzima (ADN ligasa) y reintroducir el ADN recombinante en *E. coli* con la ayuda de un plásmido vector. Poco después, genes de plásmidos de especies bacterianas no relacionadas se recombinaron in vitro y se expresaron en *E. coli*. Más tarde, se encontró que el ADN de un eucariota (una levadura) podía expresarse en una bacteria. Desde entonces son muchos los genes de células de mamífero, hombre incluido, que se han clonado; esto es, se han copiado en número altísimo por la multiplicación de la bacteria en la que fueron introducidos. Las preocupaciones iniciales acerca de la seguridad de estos procedimientos parecen injustificadas a la luz de las pruebas posteriores.

Hoy, las bacterias producen muchas proteínas que nunca sintetizaron en la naturaleza; las mejor conocidas son la insulina y el interferón. Se ha demostrado que la insulina producida por bacterias es activa e inocua en los seres humanos; el interferón obtenido a tra-

vés de técnicas de recombinación del ADN se está empezando a aplicar a pacientes humanos. El ejemplo del interferón nos ayuda a entender y valorar en sus términos el poder que encierra la técnica de recombinación del ADN en lo concerniente a la fabricación de moléculas de proteína accesibles a un costo razonable. Antes de que se extrajera de las bacterias, 50 miligramos de interferón muy impuro costaban unos dos millones de dólares. En el futuro, esa macromolécula fabricada por las bacterias podría costar sólo unas pesetas por miligramo de material puro. Se recurrirá a la técnica del ADN recombinante para fabricar hormonas, analgésicos y vacunas; considérese, además, que esos productos serán más puros que los proporcionados por métodos precedentes. Los procesos de fermentación tradicionales, en particular los de la industria de enzimas, mejorarán notablemente por la aplicación de la tecnología de recombinación del ADN. No menos interesante, la nueva tecnología dejará atrás muchos procesos químicos de gravoso consumo energético y altamente contaminantes. Se está aplicando ya al desarrollo de nuevas cepas bacterianas que habrán de convertir biomasa agrícola y forestal en combustible líquido y productos químicos.

El estudio de la recombinación genética en organismos superiores ha supuesto también un sensible avance en el desarrollo de la inmunología. En 1975, Georges Köhler y Cesar L. Milstein, del British Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology de Cambridge, fusionaron un mieloma, o célula cancerosa de la piel, de un ratón con un glóbulo blanco productor de anticuerpos; resultó un "hibridoma", o célula híbrida, que crecía en el tubo de ensayo y manufacturaba un anticuerpo específico puro. Era la primera vez que se obtenían anticuerpos monoclonales. Investigadores y médicos debían confiar en mezclas impuras de anticuerpos del suero de animal a la hora de aportar una protección inmunológica contra las enfermedades. En el mercado encontramos hoy anticuerpos monoclonales para múltiples fines.

El interés de la microbiología industrial se extiende a otras áreas. Así, la investigación de la fisiología de las células de organismos superiores, cuyas conclusiones permitirán sacarles el máximo partido, para producir metabolitos vegetales y animales. Aunque ya se han fabricado algunos metabolitos secundarios con cultivos de células vegetales, la técnica no está todavía desarrollada lo suficiente para pensar en una explotación comercial. En cultivos de células animales, sostenidas sobre partículas microscópicas (los llamados microportadores), se ha cosechado interferón humano y otras proteínas de mamíferos. Merced a tales cultivos, aumenta enormemente la relación de área superficial a volumen de fluido en células que, para crecer, deben permanecer unidas a una superficie. Se está pensando ya en la comercialización de cultivos microportadores.

Las nuevas ideas de la ingeniería genética constituirán el motor de importantes avances agrícolas; entre éstos, la sustitución de fertilizantes nitrogenados sintéticos por la potenciación del rendimiento de microorganismos naturales fijadores de nitrógeno. Una vía donde se está progresando es la del establecimiento de una relación sinergética entre bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno y plantas, tales como el maíz. En este caso, las cepas de *Azotobacter vinelandii* excretoras del amoníaco aportan nitrógeno fijado a las plantas, y las plantas suministran carbono a la bacteria.

De la agricultura pasemos a la farmacología, donde advertimos ya la aplicación de metabolitos secundarios a enfermedades de origen no bacteriano ni fúngico. Durante años, las principales drogas disponibles para el tratamiento de enfermedades no infecciosas han venido siendo productos sintéticos preparados por los químicos. De forma similar, los principales agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades parasitarias en animales se han obtenido por la selección de compuestos sintetizados químicamente y la modificación de sus estructuras. Aunque se han ensayado miles de compuestos, sólo unos pocos parecen prometedores. Resulta ya difícil encontrar nuevos compuestos de este tipo. Los productos microbianos que los sustituyen están paliando esa necesidad.

La actividad microbiana se aplica también a la detoxificación y degradación de las aguas residuales y desechos industriales. La utilidad de los microorganismos en el tratamiento de residuos se reconoce desde 1914, cuando se aplicó por primera vez el proceso de los lodos activados. El proceso de los lodos depende de una población compleja de microorganismos, que se forma naturalmente según la capacidad de cada organismo para degradar un constituyente del material de desecho y de coexistir con los demás en un sistema nutricionalmente complementario. El siguiente avance fue enriquecer los lodos inoculándolos con la mezcla deseada de microorganismos. Existen hoy cultivos puros de un único microorganismo para degradar compuestos específicos en basuras industriales, tales como bifenilos policlorurados (PCB).

Las mareas negras y el vertido de lastres y aguas de lavado de los petroleros son otros tantos problemas que plantean los residuos, cuya solución quizás esté en manos de la microbiología. Se han aislado muchos microorganismos capaces de consumir componentes del petróleo. Ciertas cepas de una de estas especies bacterianas, *Pseudomonas putida*, contienen plásmidos, algunos de cuyos genes determinan enzimas que degradan diferentes componentes del petróleo. Por ingeniería genética, se han reunido en una sola cepa las diferentes capacidades de degradar los distintos componentes. Esas cepas multiplasmídicas degradan las manchas de petróleo más deprisa que cualquiera de los microorganismos de partida.

Ciertos microorganismos se hallan detrás de un proceso metalúrgico que se remonta, al parecer, hasta la época romana: la lixiviación bacteriana de menas de bajo contenido para extraer de ellas metales. No hace falta perderse tan lejos. Bacterias, principalmente del género *Thiobacillus*, lixivian hoy, a escala comercial, cobre y uranio. Y, cómo no, la lixiviación bacteriana es objeto de nueva atención. Investigación que cubre el examen de los microorganismos resistentes a la acidez y la temperatura (hongos inclusive) por su capacidad de extracción, el estudio de los mecanismos en que se basa la afinidad de las bacterias por los metales y la manipulación genética de las bacterias para aumentar su resistencia a la toxicidad de los metales.

Al pasar revista a la historia y el estado actual de la microbiología industrial hemos ido aludiendo a un tema recurrente: las relaciones mutuamente beneficiosas entre la investigación básica y la investigación aplicada. Hace cien años, las investigaciones, fundamentalmente prácticas, de Pasteur condujeron al establecimiento de la microbiología, la inmunología y la bioquímica. Mucho más tarde, el descubrimiento de los antibióticos por microbiologías experimentales aportó las herramientas que resultarían decisivas para el desarrollo de la biología molecular. La investigación básica en genética microbiana le acaba de devolver el favor proporcionando un conjunto de nuevas técnicas para aplicaciones industriales. En este sinergismo entre ciencia y tecnología se esconde la llave que abrirá el futuro a la microbiología industrial.



Microorganismos industriales

Son, principalmente, levaduras, mohos, bacterias y actinomicetes (bacterias filamentosas); hoy se suman a ellos los cultivos de células de mamífero y los "hibridomas": nuevas células creadas por la fusión de dos líneas celulares

Herman J. Phaff

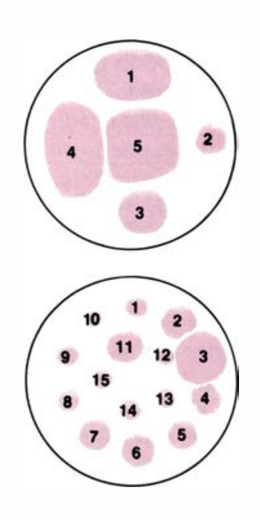
Los microorganismos que sintetizan productos útiles para el hombre representan, como máximo, unos pocos centenares de especies de entre las más de 100.000 que existen en la naturaleza. Su importancia en la fabricación de la cerveza, el vino y el pan se descubrió casi por accidente. Las levaduras que transforman la malta, el zumo de uva y la masa de pan son organismos ubicuos, como las bacterias que fermentan la leche y los mohos que determinan las características distintivas de las diversas clases de quesos. A estos tres grupos de microorganismos con aplicaciones industriales –levaduras, mohos y bacterias– debe añadirse un cuarto, los Actinomicetes, bacterias filamentosas habitantes del suelo, cuyo valor como fuente de antibióticos no se descubrió hasta la década de los cuarenta. A todos ellos hay que sumarles ya unas células que, si bien no se encuentran libres en la naturaleza, pueden fabricar sustancias útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades: cultivos de células de mamíferos.

No existe ninguna raya definida que permita dividir los microorganismos útiles de los inútiles. Todos son útiles en el sentido de que ayudan a reciclar las moléculas del mundo orgánico. En este aspecto no son meramente útiles, sino indispensables. Un considerable número de microorganismos pueden, evidentemente, ser nocivos para animales y plantas. Pero la mayoría suelen mostrarse inocuos. Los pocos que se han encontrado con utilidad industrial son apreciados por elaborar alguna sustancia que no se puede obtener de manera tan fácil o barata por otros métodos. En contados casos, el objetivo del cultivo son las mismas células microbianas, la levadura del pan, por ejemplo. Lo frecuente, sin embargo, es que la sustancia deseada sea un producto de su metabolismo, como el etanol.

La mayoría de las bacterias son organismos unicelulares pequeños, que a duras penas miden uno o varios micrometros. También las levaduras suelen ser unicelulares, aunque mayores; oscilan entre 6 y 12 micrometros. Los mohos, por contra, son pluricelulares; y, a pesar de que, si las consideramos una a una, las células son pequeñas (raramente sobrepasan los 25 micrometros en su dimensión más larga), su conjunto se distingue a simple vista. Los hongos con reproducción sexual pueden tener cuerpos fructíferos (como las setas y las trufas) de tamaño notable, formados por miles de millones de células.

Los microorganismos se dividen normalmente en dos grandes grupos: procariotas y eucariotas. Los microorganismos procarióticos, considerados los más primitivos de los dos, tienen un único cromosoma de ADN de cadena doble que se encuentra libre en el citoplasma de la célula. Los microorganismos eucarióticos, mucho mayores que los procariotas, poseen como mínimo dos cromosomas (y en algunas especies más de 20) encerrados en una envoltura nuclear con una doble membrana porosa. Los cromosomas eucarióticos, lineales, están íntimamente asociados con una clase de proteínas denominadas histonas. Las bacterias son procarióticas; las levaduras y los hongos, eucarióticos.

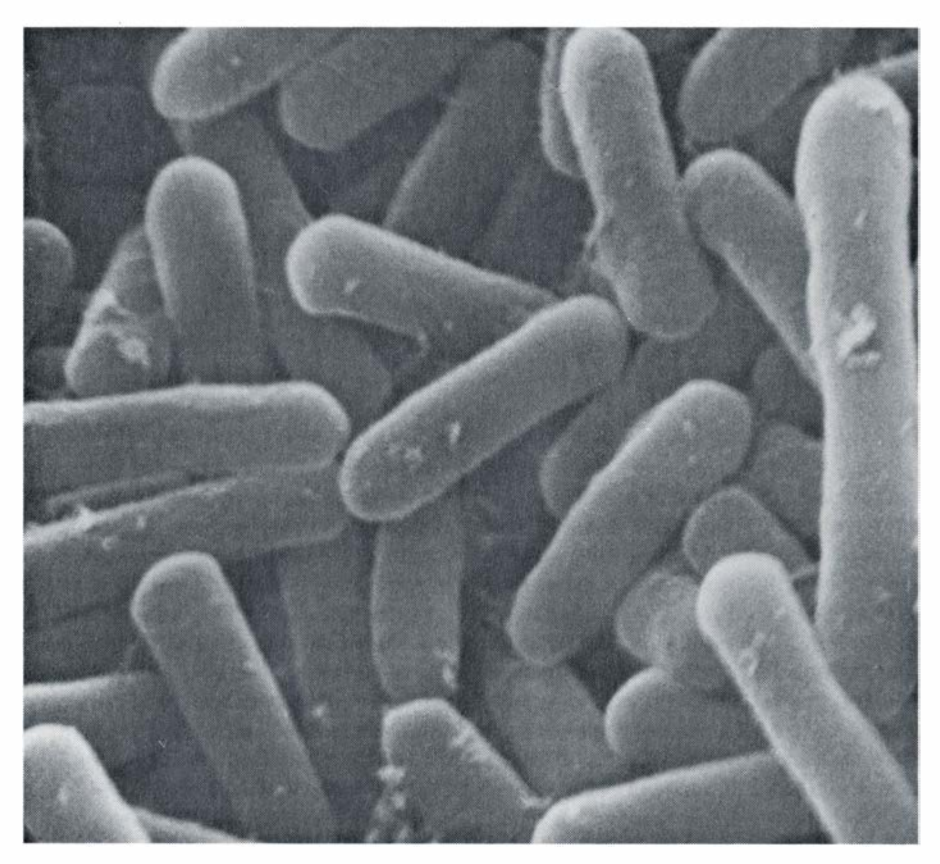
Para su crecimiento y multiplicación, los microorganismos llevan a cabo diversos procesos metabólicos, destinados a obtener energía y nuevo material celular. Los microorganismos fotosintéticos son capaces de utilizar la energía de la luz para convertir el dióxido de carbono del aire, junto con el hidrógeno del agua, en materia orgánica celular, como lo hacen las plantas superiores. Ninguno de los microorganismos industriales al uso son, sin embargo, fo-



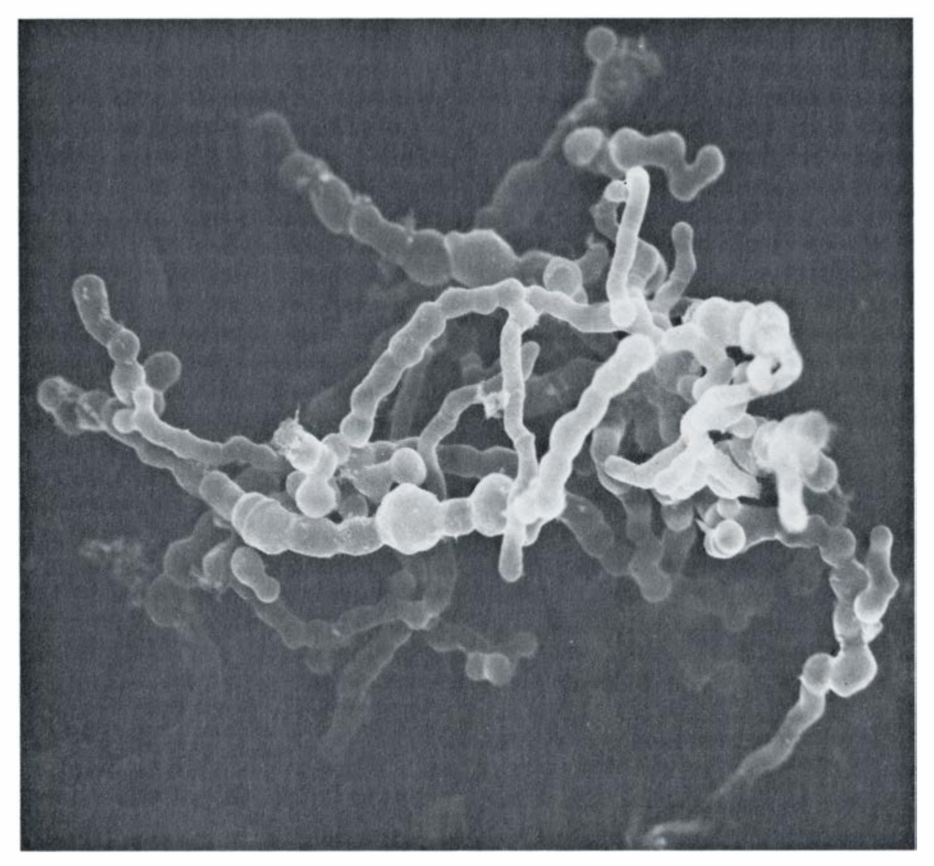
MOHOS
1 *Penicillium chrysogenum*
2 *Monascus purpurea*
3 *Penicillium notatum*
4 *Aspergillus niger*
5 *Aspergillus oryzae*

LEVADURAS
1 *Saccharomyces cerevisiae*
2 *Candida utilis*
3 *Aureobasidium pullulans*
4 *Trichosporon cutaneum*
5 *Saccharomycopsis capsularis*
6 *Saccharomycopsis lipolytica*
7 *Hanseniaspora guilliermondii*
8 *Hansenula capsulata*
9 *Saccharomyces carlsbergensis*
10 *Saccharomyces rouxii*
11 *Rhodotorula rubra*
12 *Phaffia rhodozyma*
13 *Cryptococcus laurentii*
14 *Metschnikowia pulcherrima*
15 *Rhodotorula pallida*

MOHOS Y LEVADURAS son microorganismos que forman estructuras visibles y a menudo coloreadas cuando caen o se depositan en un medio adecuado. En la fotografía de la página opuesta se muestran cultivos puros de diversos mohos (*parte superior*) y levaduras (*parte inferior*) tras ocho o diez días de haber sido sembrados en placas de medio nutritivo. Los números de la izquierda identifican los cinco mohos y las quince levaduras. Cuatro de los mohos (*1, 3, 4, 5*) y cinco de las levaduras (*1, 2, 6, 9, 10*) fabrican productos de interés comercial: cerveza, ácido cítrico, enzimas, antibióticos, sake, salsa de soja y proteína microbiana. Una de las levaduras, *Phaffia rhodozyma* (*12*), se está ensayando como suplemento alimenticio de peces explotados en piscifactorías, cuya carne tiende a ser blanca. La levadura sintetiza un carotenoide, la astaxantina, que devuelve a esta carne su color normal rosado-anaranjado. La fotografía, del autor, se tomó en la Universiad de California.



MICROORGANISMOS PROCARIOTAS DE INTERES INDUSTRIAL, representados en este caso por numerosas bacterias de la especie *Bacillus brevis*, de las que se obtiene el antibiótico gramicidina *S*. Esta micrografía electrónica de barrido, que aumenta las bacterias 9500 veces, fue obtenida por Erika A. Hartwieg, del Servicio de Microscopía Electrónica del Instituto de Tecnología de Massachusetts.



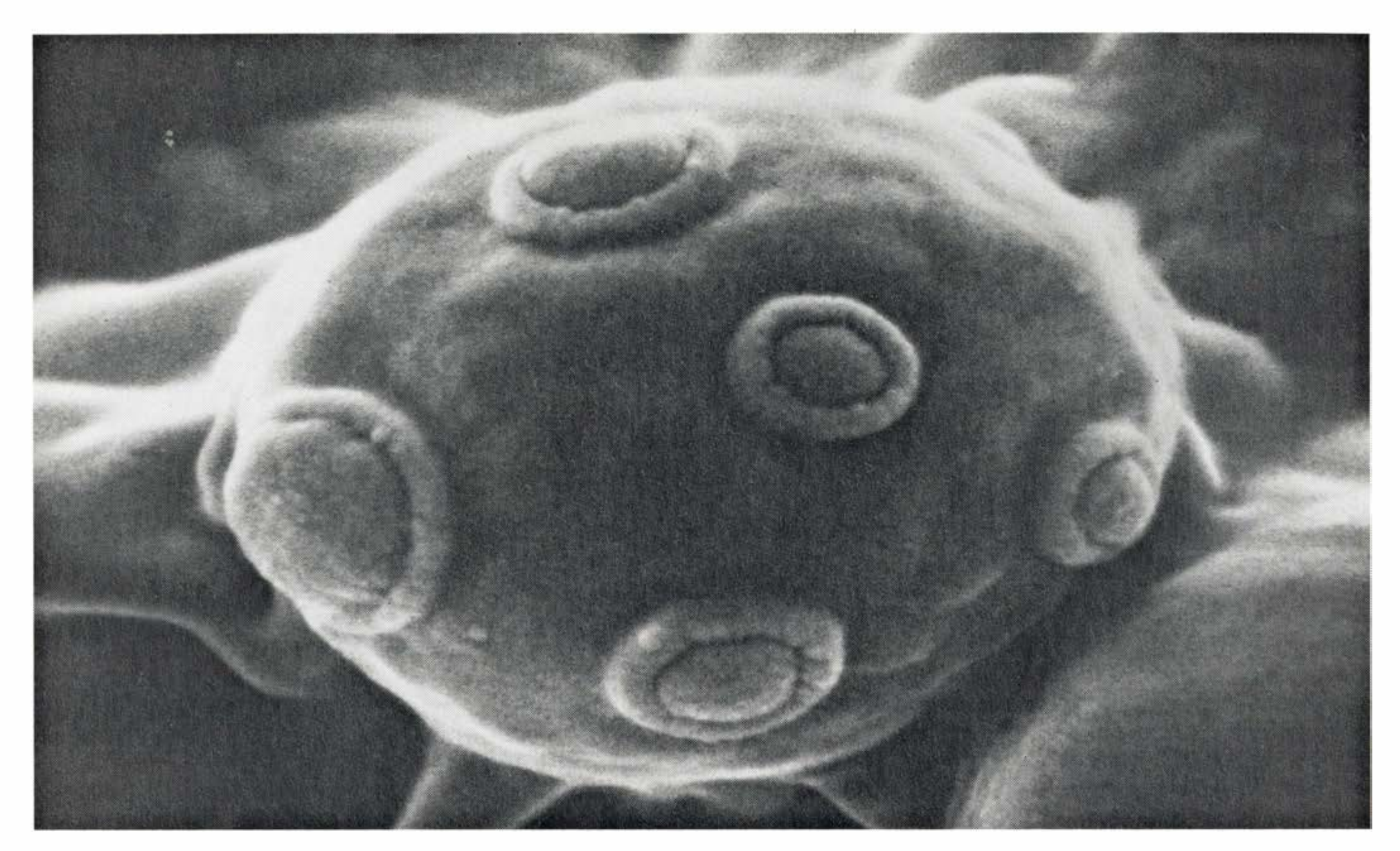
MICROORGANISMOS EUCARIOTICOS DE INTERES INDUSTRIAL, representados aquí por las hifas, o filamentos, del moho *Cephalosporium acremonium*, que produce el antibiótico cefalosporina. La hinchazón de los filamentos que se aprecia en la ilustración coincide con la fase de mayor producción del organismo. La microfotografía, que aumenta las hifas 700 veces, es propiedad, también, de Hartwieg.

tosintéticos. Una excepción, cuyo interés ha decaído bastante, lo constituyen ciertas especies de algas, consideradas años atrás fuentes prometedoras de proteínas para la alimentación. Los microorganismos industriales más comunes necesitan sustratos orgánicos para desarrollarse.

Los microorganismos pueden dividirse, de acuerdo con sus necesidades ambientales, en tres grupos. Se encuadran en el primero los aerobios estrictos, que únicamente pueden metabolizar y crecer en presencia de oxígeno atmosférico. En el segundo grupo se hallan los anaerobios estrictos, que no sólo metabolizan y crecen en ausencia de oxígeno libre, sino que requieren su eliminación, por serles perjudicial. En el tercer grupo están los organismos facultativos, capaces de cambiar su metabolismo de aeróbico (respiración) en anaeróbico (fermentación), en función del ambiente donde se hallen. Dentro de los aerobios estrictos tenemos los estreptomicetes (que son procariotas, y uno de los principales grupos productores de antibióticos) y muchos hongos filamentosos (relacionados con el queso y con los alimentos fermentados). Los anaerobios estrictos están representados por miembros del género bacteriano *Clostridium*; de entre los cuales es un ejemplo notorio *C. botulinum*, productor de la toxina del botulismo. Las levaduras industriales, que pueden respirar o fermentar ciertos sustratos, son organismos facultativos.

El metabolismo anaeróbico es siempre menos eficiente que la respiración, ya que la fermentación no aprovecha toda la energía del sustrato orgánico (por ejemplo, un azúcar) para la producción del combustible universal de la célula (el compuesto trifosfato de adenosina, o ATP) ni, por tanto, para la síntesis de material celular. Algún sustrato potencial lo excretan las células en forma de producto de degradación, que podría ser oxidado ulteriormente a dióxido de carbono y agua. Los productos de la fermentación, tales como el etanol liberado por la fermentación de las levaduras, no puede metabolizarlos, en condiciones anaeróbicas, el organismo que los produce.

Varían mucho los tipos de vías bioquímicas fermentativas que originan productos útiles (y en consecuencia metabolizados de forma incompleta). Por ejemplo, las levaduras pueden fermentar una molécula de un azúcar monosacárido de seis carbonos, como la glucosa o la fructosa, produciendo dos moléculas de etanol y dos de dióxido de



CELULA DE LEVADURA de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, que es también un eucariota, se presenta en esta micrografía electrónica de barrido. Las levaduras pueden reproducirse asexualmente por gemación o sexualmente. Las protuberancias de esta célula corresponden a cicatrices que han dejado las yemas al separarse. La microfotografía, que aumenta la célula 12.500 veces fue tomada por Martin W. Miller, de la Universidad de California.

carbono. Pero podríamos agrupar esas vías en dos tipos generales: homofermentativos (un producto principal) o heterofermentativos (dos o más productos). Un grupo de las bacterias del ácido láctico son homofermentativas, es decir, convierten la glucosa en ácido láctico. Otro grupo de las mismas bacterias son heterofermentativas, convierten la glucosa, por diferentes vías bioquímicas, en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. *Clostridium acetobutylicum* es otro organismo heterofermentativo, que convierte la glucosa en una mezcla de acetona, etanol, isopropanol y butanol.

El crecimiento aeróbico, por otra parte, capacita a algunos organismos para oxidar completamente una cierta fracción del sustrato y extraer así la máxima energía para convertir el resto del sustrato en masa celular. Si el objetivo de la fermentación industrial es aumentar la masa celular, piénsese en la producción de levadura del pan o de proteínas microbianas como fuente de alimentación, resulta una ventaja obvia tener un crecimento aeróbico con utilización completa del sustrato por respiración. En cualquier caso, uno puede preguntarse cómo el crecimiento aeróbico puede llevar a la fabricación de productos microbianos útiles, si todo el sustrato no convertido en masa celular es oxidado a CO_2 y agua.

A ello cabe responder, por un lado, que no todas las reacciones oxidativas catalizadas por microorganismos aerobios estrictos se llevan hasta el último extremo. Nos vale de ejemplo la conversión de etanol en ácido acético (vinagre) por las bacterias del ácido acético: CH_3CH_2OH (etanol) + $O_2 \rightarrow$ CH_3COOH (ácido acético) + H_2O. Las bacterias del ácido acético son también capaces de llevar a cabo oxidaciones incompletas con otros sustratos, como la conversión de glucosa en ácido glucónico. Aunque estos "suboxidadores" recaban energía en forma de ATP a partir de las oxidaciones incompletas, generalmente no pueden obtener "esqueletos" carbonados para su crecimiento a partir de los sustratos oxidados de forma incompleta y, por consiguiente, requieren para su crecimiento otros nutrientes suministrados por el medio.

En otros casos pueden conseguirse compuestos orgánicos de interés, a partir de organismos aerobios, por manipulación genética de las vías biosintéticas a través de las cuales el organismo convierte el sustrato en los miles de moléculas diferentes que constituyen una célula viva. En el metabolismo normal, todos los compuestos que necesita la célula se sintetizan en la cantidad justa. Este control se realiza por una serie de reacciones reguladoras estrictas que detienen la formación de productos intermedios y finales de una reacción metabólica, cuando un compuesto dado alcanza una determinada concentración. El microbiólogo industrial ha aprendido a seleccionar cepas mutantes en las que estos precisos mecanismos reguladores están alterados a voluntad. Por ejemplo, en células normales, la síntesis de lisina, uno de los 20 aminoácidos de las proteínas celulares, está regulada de forma que solamente se produce la cantidad necesaria para la fabricación de las miles de proteínas que la célula precisa. Sin embargo, se han encontrado algunos mutantes de *Corynebacterium glutamicum* en los que el mecanismo de regulación de la lisina es tan defectuoso que hay una sobreproducción de lisina superior a 50 gramos por litro de medio de cultivo. La lisina y los productos similares de bajo peso molecular que son componentes esenciales para el crecimiento celular reciben el nombre de metabolitos primarios.

Otro grupo de productos microbianos de importancia industrial, llamados metabolitos secundarios, son compues-

tos no requeridos para la biosíntesis celular. Estos productos son sintetizados por algunos microorganismos, generalmente en las últimas fases del ciclo de crecimiento, por razones a menudo poco claras. Los ejemplos más conocidos son los antibióticos. Dado que los metabolitos secundarios no desempeñan un papel directo en el metabolismo energético ni en el crecimiento del organismo, seguramente contribuyan a la supervivencia del organismo al inhibir la acción de competidores que pudieran ocupar el mismo nicho ecológico.

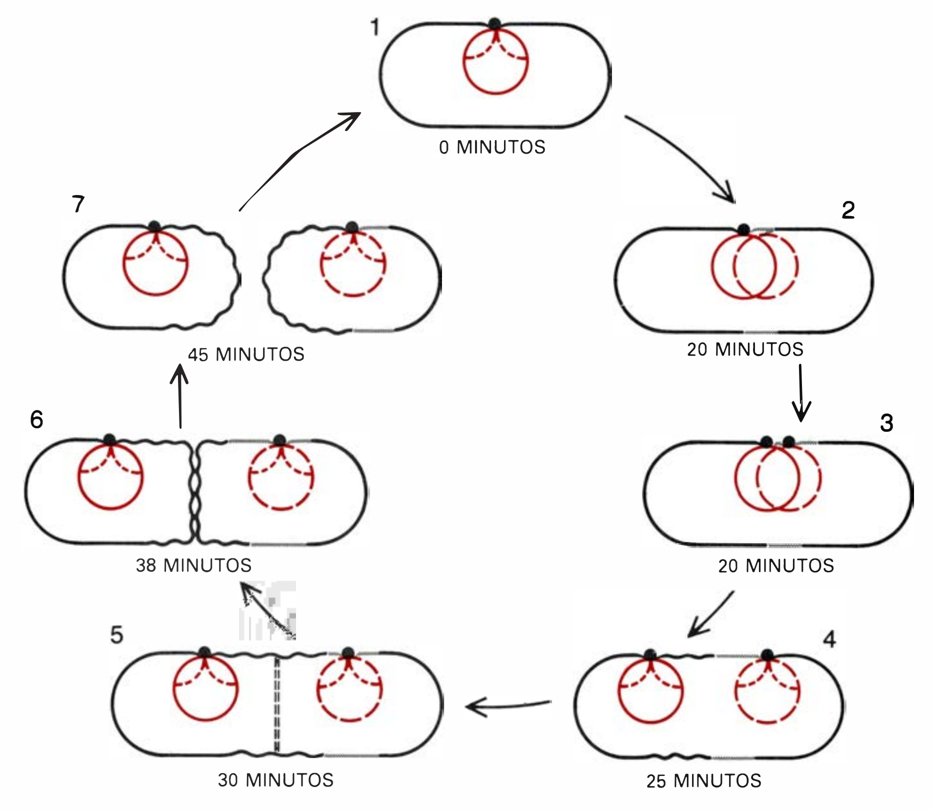
Los organismos que excretan metabolitos secundarios presentan inicialmente un período de crecimiento rápido, la trofofase, en que no se manifiesta la síntesis de la sustancia secundaria. Cuando el crecimiento posterior se detiene por agotamiento de uno o más nutrientes esenciales del medio, el organismo entra en la idiofase: la fase característica de ese organismo. No se conoce el mecanismo disparador de la síntesis de metabolitos secundarios en la idiofase. Muchos organismos son sensibles a sus propios antibióticos durante la trofofase, pero se convierten en fisiológicamente resistentes a lo largo de la idiofase: así pues, el retraso en la secreción de los metabolitos secundarios es crucial para evitar que los organismos productores de antibióticos se destruyan a sí mismos.

Un tercer grupo de sustancias de interés industrial sintetizadas por microorganismos son las proteínas que actúan como enzimas. Puesto que las proteínas típicas están formadas por varios cientos de aminoácidos, pocas han podido ser sintetizadas en el laboratorio y ningún enzima natural se ha producido industrialmente. Los microorganismos cuentan con enzimas catabólicos para degradar los sustratos complejos en moléculas más simples que puedan asimilarse. Los enzimas anabólicos, o biosintéticos, son los encargados de reordenar las moléculas sencillas para construir las sustancias (entre ellas los enzimas de ambos tipos) necesarias para el metabolismo y el crecimiento celular. Como ocurre con los aminoácidos, la célula sólo sintetiza normalmente la cantidad de cada enzima que le es necesaria. Sin embargo, como con la regulación de la síntesis de aminoácidos, pueden seleccionarse organismos superproductores de enzimas concretos si se someten a las condiciones ambientales adecuadas y se les suministran los nutrientes necesarios.

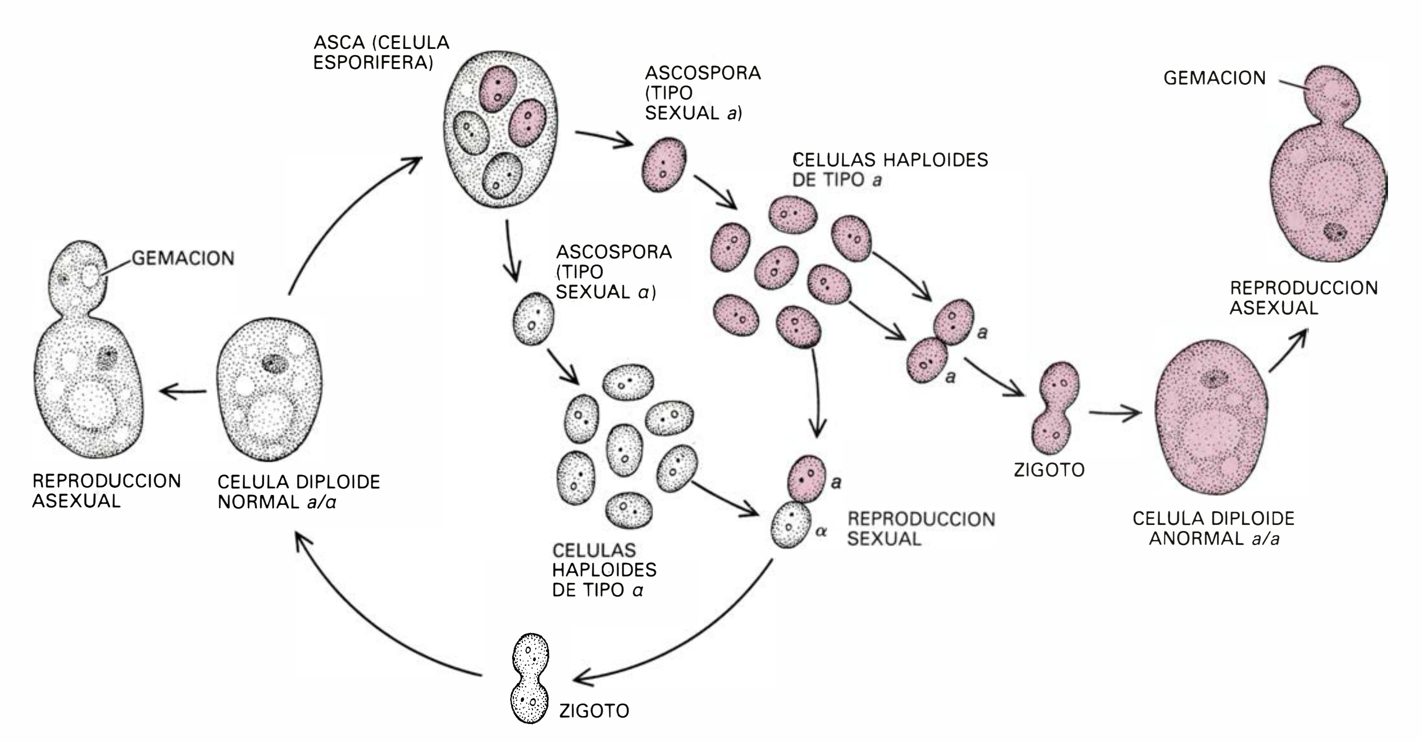
Un método para aumentar la síntesis de un enzima es el de la inducción. La información genética para cada enzima se halla en la secuencia de nucleótidos del ADN denominada gen estructural, residente en el cromosoma único de un procariota o en uno de los diversos cromosomas de un eucariota. Los genes estructurales que codifican para la síntesis de muchos enzimas se encuentran normalmente inactivos en ausencia del sustrato del enzima o de una molécula análoga desde el punto de vista estructural. En estas condiciones se dice que la producción del enzima está reprimida. Al añadir el sustrato o el análogo al medio, se activa el gen estructural y se sintetiza el enzima. Este fenómeno recibe el nombre de desbloqueo (desrepresión) o inducción, y los enzimas que lo protagonizan se denominan enzimas inducibles (para distinguirlos de los constitutivos, que carecen de una regulación de este tipo).

En algunos casos, el inductor es el producto de una reacción enzimática. Por ejemplo, la maltosa (un producto intermediario en el metabolismo de los azúcares) puede inducir en *Aspergillus niger* la síntesis de glucamilasa, un enzima que rompe la cadena del almidón liberando glucosa. Aunque el sustrato sobre el que actúa la glucamilasa es el almidón, no es necesario que éste se halle presente en el medio para inducir la síntesis del enzima. Se sigue de ello que algunos análogos que son sustratos pobres o incluso inactivos pueden resultar inductores de extremado vigor.

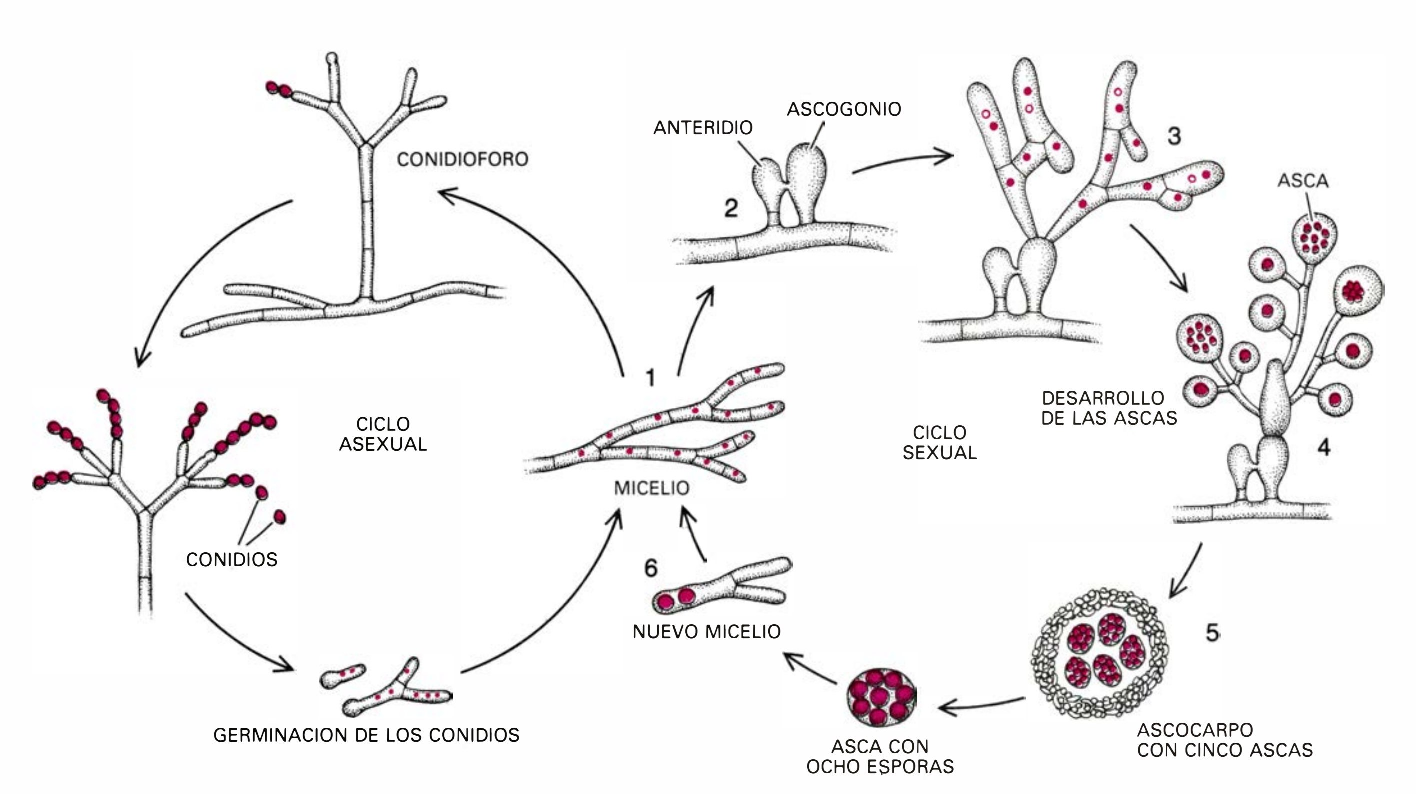
El modelo de inducción más ampliamente admitido es el propuesto hace unos 20 años por François Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur. En síntesis, en las células que no han sido expuestas a un inductor, el gen estructural del enzima no puede transcribirse a ARN mensajero (primer paso en la traducción del gen) porque la ARN polimerasa, el enzima que lleva a cabo la síntesis del ARN mensajero, no puede actuar a causa de que un gen operador, adyacente al gen estructural en el ADN, está bloqueado por una proteína represora. La proteína represora, a su vez, está codificada por un gen represor cercano. Cuando se hallan presentes moléculas del inductor, se unen a las moléculas del represor, impidiendo que éstas bloqueen el gen operador. Ya liberado este gen, la ARN polimerasa puede transcribir el gen estructural en ARN mensajero, el cual, a su vez, dirige la formación del enzima a partir de los aminoácidos adecuados.



REPRODUCCION DE LAS BACTERIAS, que se lleva a cabo asexualmente por división celular. El diagrama presenta siete etapas del ciclo de vida de la bacteria del colon *Escherichia coli*, con un tiempo de generación de 45 minutos. En la célula recién separada (*1*), el único cromosoma circular de ADN (*en color*) está empezando la replicación (*líneas a trazos*). Al cabo de 20 minutos, el nuevo cromosoma está completo y se ha fijado a un punto de unión dentro de la célula (*2, 3*). A los 25 minutos, los dos cromosomas han empezado a replicarse (*4*) y aparece en medio de la célula un septo, o membrana divisoria (*5*). A los 38 minutos, el septo es una pared (*6*). Siete minutos más tarde, la división bacteriana se ha completado.



REPRODUCCION DE LAS LEVADURAS, normalmente asexual, mediante formación de yemas en la superficie celular, si bien puede inducirse la reproducción sexual en condiciones especiales. En el ciclo sexual, una célula diploide normal (una célula con dos conjuntos de cromosomas y por consiguiente con dos dotaciones de genes) da lugar a dos ascas, o células esporógenas, que contienen cuatro ascósporas haploides (células con una sola dotación cromosómica y de genes). Las ascósporas son de dos tipos sexuales: *a* y α. Cada tipo puede desarrollar células haploides por gemación. La unión de una célula haploide *a* con otra α da lugar a una célula normal diploide *a*/α. Las células haploides del mismo sexo pueden también unirse ocasionalmente, formando células diploides anormales (*a*/*a* o α/α) que sólo pueden reproducirse asexualmente por gemación. Las levaduras industriales suelen hacerlo por gemación.



REPRODUCCION DE UN HONGO MULTICELULAR, como los ascomicetes superiores, que puede ser sexual o asexual. Los detalles varían según el género y la especie. La estructura vegetativa ramificada común a ambos ciclos reproductivos es el micelio, compuesto por hifas (*1*). En el ciclo asexual, el micelio da origen a conidióforos que contienen las esporas denominadas conidios, que son dispersadas por el viento. En el ciclo sexual, el micelio desarrolla estructuras de gametangio (*2*); consta cada una de un anteridio (que contiene núcleos "+") y un ascogonio (que contiene núcleos "−"). Los núcleos se aparean en el ascogonio pero no se fusionan. A partir del ascogonio fecundado (*3*) se desarrollan unas hifas binucleadas ascógenas y los pares de núcleos sufren mitosis que replican los cromosomas. Finalmente, los núcleos se fusionan en el proceso denominado cariogamia (*4*), en el extremo de la hifa ascógena. Este es el único estado diploide del ciclo de vida. Poco después, el núcleo diploide (*puntos de color grandes*) sufre meiosis, o división reductora. El resultado son ocho núcleos haploides (*puntos de color pequeños*), cada uno de los cuales produce una ascóspora. Al mismo tiempo, las ascas desarrolladas quedan encerradas por una hifa micelial en un ascocarpo (*5*). Las ascósporas germinan produciendo un micelio que puede ser binucleado o multinucleado (*6*).

Algunos enzimas catabólicos, como las amilasas (degradadoras de almidón) y las proteasas (degradadoras de proteínas), pueden obtenerse a partir de microorganismos en cantidades superiores a las normales, alterando el proceso conocido como represión por catabolito. Este término describe la disminución de la velocidad de síntesis de un enzima catabólico que se produce al exponer las células microbianas a una fuente de carbono rápidamente asimilable. Como esta fuente de carbono es generalmente la glucosa, el fenómeno recibe a veces el nombre de efecto glucosa. Hay algunos casos, incluso, en que el rápido catabolismo del propio inductor origina la represión por catabolito. En tales ejemplos, un lento suministro del inductor (o la sustitución por un análogo del inductor que se metabolice lentamente) puede estimular enormemente la síntesis del enzima deseado.

La causa fundamental de la represión por catabolito radica en que las células a las que se suministra una fuente de carbono de rápida asimilación poseen una baja concentración intracelular de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). En ausencia de suficiente AMPc, los genes estructurales que codifican los enzimas en cuestión no se transcriben con eficacia, y prácticamente no se sintetiza enzima. La comprensión de la represión por catabolito es de gran importancia en la microbiología industrial, ya que muchos enzimas de valor comercial se obtienen de microorganismos que presentan este fenómeno.

Un tipo totalmente diferente de productos metabólicos que se obtiene en gran cantidad de los microorganismos son los polisacáridos capsulares, principalmente dextrano y xantano. El dextrano, un polímero de glucosa de un peso molecular comprendido entre 50.000 y 100.000 dalton, puede utilizarse como aditivo del plasma sanguíneo. Cuando sus cadenas poseen enlaces cruzados, presenta propiedades de tamiz molecular. El xantano, que puede consumir el hombre, se añade a muchos productos alimenticios para dar consistencia y como estabilizador. También tiene aplicación en campos tan diversos como el del estampado y teñidos textiles, en la perforación de pozos de petróleo (de aditivo al lubricante de perforación) y en cosmética y farmacia.

Los polisacáridos capsulares son sustancias de elevado peso molecular que forman una gruesa cápsula alrededor de las células de ciertos microorganismos. Se pueden obtener grandes cantidades de dextrano a partir de *Leuconostoc mesenteroides* y otras bacterias lácticas relacionadas; pero sólo cuando su crecimiento se realiza con sacarosa como sustrato. En la cápsula bacteriana, el dextrano es un polímero de glucosa con un peso molecular que oscila entre 15.000 y 20 millones de dalton, según la cepa bacteriana. Esas bacterias poseen un enzima denominado transglucosidasa o dextranosacarasa, que hidroliza el disacárido sacarosa en fructosa y glucosa. La fructosa se destina al crecimiento bacteriano y la glucosa se polimeriza molécula a molécula dando lugar a una cadena de dextrano. La síntesis enzimática de dextrano puede llevarse a cabo con células enteras o con extractos celulares. El xantano es sintetizado por la bacteria *Xanthomonas campestris* cuando crece aeróbicamente en presencia de glucosa. El polisacárido de este organismo es ramificado y más complejo que el dextrano. Está constituido por glucosa, manosa (otro monosacárido de seis carbonos) y ácido glucurónico; algunos de estos compuestos poseen grupos acetilo (CH_3CO-) y piruvato (CH_3COCO-) unidos a sus moléculas.

Las levaduras se han explotado durante millares de años para la fabricación de pan y de bebidas alcohólicas antes de que se supiera que eran microorganismos y se descubriera la verdadera naturaleza de la fermentación. La presencia de levaduras en la cerveza en fermentación fue detectada por primera vez por Anton van Leeuwenhoek, en 1680, a quien se conoce por la invención del precursor del microscopio moderno. Cerca de 200 años después, en 1876, Pasteur presentó sus ideas sobre la fermentación en un trabajo ya clásico, *Études sur la bière*, en el que postulaba que microorganismos

FERMENTACION ACETO-BUTANOLICA. La lleva a cabo, anaeróbicamente, *Clostridium acetobutylicum*. El diagrama presenta la serie de reacciones intracelulares que convierten dos moléculas de glucosa en una molécula de butanol, una molécula de acetona, cuatro moléculas de hidrógeno y cinco de dióxido de carbono. Como producto minoritario se forman pequeñas cantidades de etanol. En el proceso, cuatro moléculas de difosfato de adenosina (ADP) y cuatro átomos de fosfato inorgánico se convierten en cuatro moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), el combustible universal de los procesos intracelulares. El acetil-CoA (acetil-coenzima A) es un coenzima que desempeña un papel clave en el metabolismo de todas las células. La molécula dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) es un aceptor de átomos de hidrógeno; su forma reducida, $NADH_2$, es un donador de átomos de hidrógeno. Las reacciones indicadas por asteriscos las llevan a cabo enzimas específicos. *Clostridium* fermenta también almidón y pectinas.

que vivían en condiciones anaeróbicas eran capaces de desarrollarse y crecer sustituyendo el proceso de la respiración, que llevan a cabo muchos microorganismos, por el proceso de la fermentación. Asimismo afirmó que la fermentación que convierte el azúcar en alcohol y dióxido de carbono suministra a las células de levadura la energía necesaria para vivir en ausencia de oxígeno. Pasteur sostenía, además, que si las células de levadura se encontraban en presencia de oxígeno, la fermentación se reprimía y se sustituía en grado variable por la respiración. En este último proceso, el azúcar se oxidaba totalmente a dióxido de carbono y agua.

Mientras que los enzimas de la fermentación son constitutivos, los de la respiración son inducibles. Los enzimas que intervienen en la fermentación se encuentran en el citoplasma de la célula; los enzimas de la respiración están, en los eucariotas, en unos orgánulos denominados mitocondrias. Los enzimas de la respiración se hallan sujetos a represión por catabolito. Por esta razón, cuando la levadura crece con plena aireación para obtener la máxima producción de masa celular, como en el caso de la fabricación de levadura del pan, es esencial que la concentración de azúcar no exceda el 1 por ciento en más allá de unas pocas décimas. Se evita así la represión por catabolito de los enzimas de la respiración, y prácticamente todo el azúcar añadido es respirado, en vez de convertirse en alcohol a través de la fermentación.

Los únicos azúcares que las levaduras pueden fermentar son los monosacáridos de seis carbonos (o sus polímeros). Los disacáridos, como la sacarosa y la maltosa, primero son degradados a monosacáridos por los enzimas hidrolíticos de la célula. En procesos industriales tales como la fabricación de whisky y cerveza, en los que el almidón constituye el sustrato principal de la fermentación, este producto es hidrolizado hasta monosacáridos por la adición de enzimas amilasas de cebada o de algunas especies de hongos. Si bien existen especies de levaduras que pueden crecer degradando almidón, pues fabrican sus propias amilasas, estas cepas no son muy eficientes en la producción industrial de alcohol.

Cuando se cultivan levaduras en condiciones aeróbicas, puede explotarse como sustratos una mayor gama de compuestos, en función de la especie seleccionada. Algunas levaduras pueden metabolizar pocos compuestos, otras son capaces de utilizar muchos. Por ejemplo, la capacidad que tiene *Candida utilis* de metabolizar las pentosas (monosacáridos de cinco átomos de carbono) xilosa y arabinosa permite el crecimiento de esta especie en las aguas de desecho de las fábricas papeleras.

Otras levaduras, como por ejemplo *Saccharomycopsis lipolytica*, son capaces de metabolizar hidrocarburos de cadena lineal de 10 a 16 átomos de carbono. En instalaciones piloto se han cultivado levaduras en fracciones purificadas de petróleo. Las células de levadura oxidan, en primer lugar, los hidrocarburos a ácidos grasos de cadena larga, por medio de enzimas de hidroxilación. Estos ácidos grasos son degradados a continuación por un proceso oxidativo especial que produce acetil coenzima A, transformado posteriormente en material celular. Otro sustrato de interés industrial es el metanol (CH_3OH), un alcohol sencillo que puede fabricarse por oxidación del gas metano o a partir del carbón. El metanol puede ser asimilado por un número limitado de especies de levaduras a través de un proceso metabólico muy particular, que utiliza unos orgánulos celulares especializados denominados microcuerpos. Las levaduras cultivadas de esta forma pueden aprovecharse como suplemento proteínico en piensos.

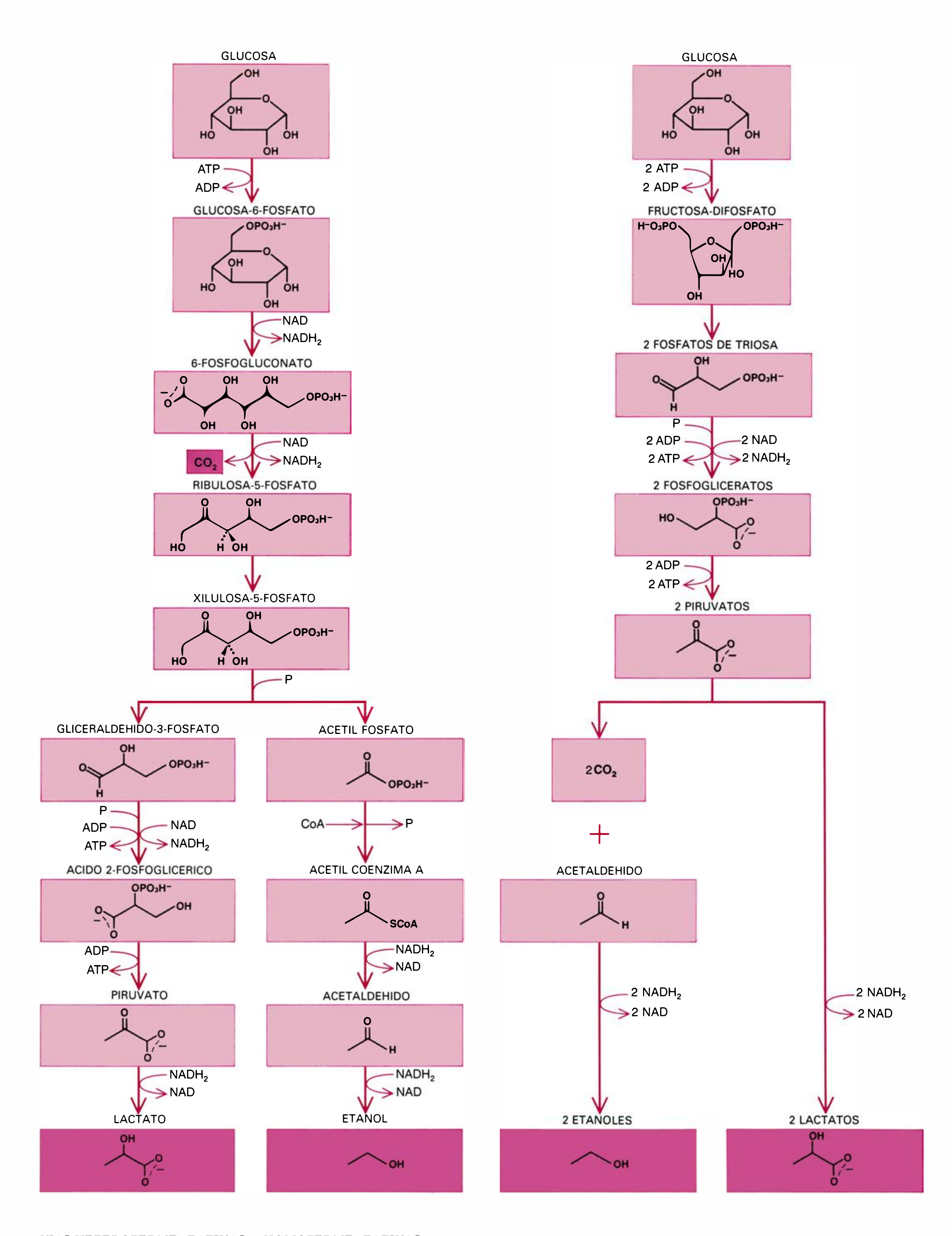
Casi todas las levaduras están capacitadas para convertir el nitrógeno inorgánico en proteínas y ácidos nucleicos. El nitrógeno puede asimilarse en forma de iones amonio (NH_4^+) y por algunas especies en forma de iones nitrato (NO_3^-). La capacidad de las levaduras de convertir el nitrógeno inorgánico en proteínas celulares se está explotando para la fabricación de proteína microbiana, frecuentemente denominada proteína unicelular, que puede servir de complemento de la alimentación animal y humana.

A continuación se discutirá brevemente qué son las levaduras, cómo se reproducen y qué lugar ocupan en el reino de los Micota, u hongos. Debido a que las levaduras crecen predominantemente en forma unicelular, se las llama más de una vez microhongos. La mayoría de las 500 especies de levaduras conocidas se han clasificado taxonómicamente desde el punto de vista de la reproducción, que puede ser sexual o asexual. Tres clases de hongos acogen a las levaduras: los Ascomicetes, los Basidiomicetes y los Deuteromicetes.

La primera clase incluye las levaduras cuyas estructuras reproductoras sexuales son las sencillas ascas y ascósporas. Una célula diploide de levadura (una célula con dos dotaciones cromosómicas emparejadas) sufre meiosis (división reductora) y forma de cuatro a ocho ascósporas, encerradas en un asca o saco. Las ascósporas son células haploides (que sólo tienen una dotación cromosómica); células haploides de diferentes sexos se combinan para formar un nuevo organismo diploide. Esta forma de reproducción sexual puede ser manipulada por los investigadores para hacer hibridaciones genéticas que mejoren las cepas. Numerosas especies de levaduras pertenecen a la clase Ascomicetes, pero sólo unas pocas son de importancia industrial. La que sin duda fue la primera y aún la más utilizada por el hombre es *Saccharomyces cerevisiae*, de la que se emplean diferentes cepas para la fabricación de cerveza, vino, sake, pan y alcoholes industriales. *Kluyveromyces fragilis* es una especie fermentadora de la lactosa que se explota en pequeña escala para la producción de alcohol a partir del suero de la leche. *Saccharomycopsis lipolytica*, la especie capaz de metabolizar hidrocarburos, es una fuente industrial de ácido cítrico.

La clase Basidiomicetes no ha aportado levaduras de importancia industrial. Incluye ciertas setas, tizones y royas. Estos organismos se reproducen formando esporas asexuales externas en una estructura denominada basidio o en un promicelio originado a partir de una telióspora.

La clase Deuteromicetes incluye levaduras de las que no se conoce reproducción sexual; se reproducen sólo de forma vegetativa, generalmente por gemación. Esta clase comprende unas pocas especies relevantes desde el punto de vista industrial. Una de ellas es *Candida utilis*, la levadura que puede cultivarse con aguas de desecho de las papeleras. Otra, *Trichosporon cutaneum*, desempeña un importante papel en los sistemas de digestión aeróbica de aguas residuales, debido a su enorme capacidad de oxidación de compuestos orgánicos, incluidos algunos que son tóxicos para otras levaduras u hongos, como los derivados fenólicos. Una especie identificada recientemente, *Phaffia rhodozyma*, posee la capacidad de fabricar un carotenoide poco usual. Los carotenoides se numeran entre los pigmentos vegetales. El carotenoide astaxantina sintetizado por esta levadura se está ensayando como fuente de pigmentación para los salmones y truchas criados en piscifactorías. La astaxantina da a la carne de trucha y de salmón su color rosado-anaranjado normal. La



VIAS HETEROFERMENTATIVAS Y HOMOFERMENTATIVAS, esto es, vías con varios o un solo producto principal, comparadas en dos secuencias de reacciones. El diagrama de la izquierda muestra el proceso por el que la bacteria heterofermentativa del ácido láctico *Leuconostoc* transforma una molécula de glucosa en una de dióxido de carbono, ácido láctico y etanol. El diagrama de la derecha presenta el modo en que dos organismos homofermentativos, una levadura y una bacteria, fermentan la glucosa con idéntica secuencia de reacciones hasta la formación de dos moléculas de ácido pirúvico. A partir de aquí las vías difieren. La levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, convierte las dos moléculas de ácido pirúvico en dos moléculas de dióxido de carbono y otras dos de etanol. La bacteria, un estreptococo, produce dos moléculas de ácido láctico a partir de las dos moléculas de ácido pirúvico.

carne de un pescado criado en cautividad és blanca, pero puede adquirir su color normal si el pez se alimenta con una fuente del pigmento.

La reproducción vegetativa de las especies industriales de levaduras se lleva a cabo, principalmente, por la formación repetida de yemas en la superficie celular. Una célula madre da lugar a diversas células hijas, que posteriormente sufren un proceso de gemación. La forma de la célula vegetativa varía desde alargada hasta ovalada. Muchas levaduras en las condiciones industriales de crecimiento se reproducen sólo de forma vegetativa. El ciclo sexual, cuando existe, únicamente se induce por condiciones especiales de cultivo.

Los mohos son hongos filamentosos que constituyen un amplio grupo de eucariotas sin clorofila y, conjuntamente con las levaduras, constituyen el reino Micota. Los mohos se conocen desde mucho antes que las levaduras, gracias a su tendencia a formar estructuras parecidas a tejidos somáticos sobre muchas clases de alimentos. Todo el mundo ha visto naranjas enmohecidas, cereales en condiciones similares y los mohos azules o verdosos del queso.

En ocasiones, la parte visible no es el tejido somático, sino el cuerpo fructífero sexual. Por ejemplo, el cuerpo vegetativo de las setas está oculto en el suelo, y solamente sobresale de él la sombrilla. Algo similar ocurre con los hongos adheridos al tronco de los árboles moribundos. El cuerpo vegetativo de estos hongos se nutre de la celulosa o lignina de la madera en degradación, por lo que no resulta visible. Las estructuras reproductoras generadoras de esporas se encuentran en el tronco y pueden pesar varios kilos. Muchas enfermedades de plantas y animales las causan los hongos. Hay hongos que son parásitos obligados, lo que significa que dependen de un huésped vivo para completar su ciclo vital, mientras que otros son oportunistas. Estos últimos viven sobre materia orgánica inerte, aunque pueden llegar a atacar un huésped vivo, particularmente aquéllos cuyas defensas naturales estén disminuidas por una u otra razón.

Además de poseer núcleo verdadero y carecer de la posibilidad de realizar la fotosíntesis, los hongos (excluyendo las levaduras, que son unicelulares) se caracterizan generalmente por tener un cuerpo vegetativo o tejido somático filamentoso y ramificado, así como una pared celular constituida por varios polímeros unidos de glucosa (conocidos por glucanos), de glucosamina (quitosano) y *N*-acetilglucosamina (quitina). En ocasiones, no muchas, la pared celular está compuesta enteramente de quitina. Estas estructuras vegetativas tubulares que constituyen el micelio reciben el nombre de hifas. Las hifas pueden estar separadas en células individuales por medio de septos o bien pueden carecer de ellos; en este último caso, el micelio se dice que es cenocítico. La mayoría de las células de hongos tienen varios núcleos, incluso cuando la hifa está formada por una serie de células individuales separadas por septos. Aunque algunos hongos no responden a estas características, sí que lo hacen los hongos de interés industrial.

Los hongos pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente. Los hongos asexuales generan varias clases de esporas asexuales unicelulares por división del núcleo celular. Las esporas se desarrollan en los esporóforos, estructuras especializadas que se extienden en el aire a partir del micelio vegetativo. Las esporas se acumulan en el extremo superior de estas estructuras. Si están encerradas en un esporangio, o estructura en forma de saco, se las denomina esporangiósporas. Los conidios son esporas no encerradas en un saco. Al madurar, las esporangiósporas y los conidios son esparcidos por el viento. Si caen en un sustrato adecuado, germinan y forman un nuevo micelio que producirá a su vez nuevas estructuras reproductoras.

La morfología de las estructuras que contienen las esporas es muy variable y constituye una de las bases de la clasificación de los hongos. El micelio somático generalmente no es suficientemente discriminador para utilizarlo en la clasificación. El color de muchos mohos que viven en materia orgánica en descomposición se debe al color de sus esporas asexuales. Estas presentan varias tonalidades de color blanco, azul, verde, rojo, marrón o negro.

Muchos hongos pueden reproducirse también a través de esporas sexuales, generadas por meiosis, o división reductora, de un núcleo diploide. En la meiosis, el número de cromosomas se divide por la mitad. Las esporas sexuales contienen sólo un cromosoma de cada par homólogo. La condición diploide se restablece cuando dos esporas haploides se unen, completando el ciclo vital. A los hongos a los que no se les conoce ciclo sexual, como las levaduras, se les sitúa en la clase de los Deuteromicetes, también denominados hongos imperfectos.

Los hongos de importancia industrial y con estructuras reproductoras sexuales corresponden a tres grupos: Ascomicetes, Basidiomicetes y Zigomicetes. Como las levaduras, los hongos ascomicetes producen sus esporas en ascas. Sin embargo, en los verdaderos hongos filamentosos, las ascas se forman dentro de un complejo cuerpo fructífero, el ascocarpio. De forma similar, los hongos basidiomicetes desarrollan sus esporas sexuales externamente, en los basidios, que se hallan encerrados en un complejo cuerpo fructífero, el basidiocarpo. Los hongos de la clase Zigomicetes producen zigósporas sexuales, casi de tamaño microscópico. En condiciones naturales, los hongos se reproducen en la mayoría de los casos asexualmente; las estructuras reproductoras sexuales sólo aparecen ocasionalmente en circunstancias favorables. Los hongos de interés industrial se cultivan en la mayoría de los casos en tanques, como masas sumergidas de micelio. En estas condiciones artificiales nunca se producen esporas, ni sexuales ni asexuales.

Los requerimientos nutritivos de los hongos son muy parecidos a los que ya se han descrito para las levaduras, salvo en que los hongos (cuyo número de especies sobrepasa en más de cien veces al de las levaduras) presentan más diversidad en los tipos de sustratos orgánicos que pueden asimilar. Por ejemplo, no se conocen levaduras que puedan crecer en celulosa o lignina, mientras que hay hongos capaces de hacerlo. Por otra parte, muchas levaduras pueden llevar a cabo una fermentación anaeróbica de azúcar a etanol, mientras que los hongos, con algunas pocas excepciones, son aerobios estrictos. Los hongos pueden asimilar nitrógeno orgánico o inorgánico, pero ningún hongo ni levadura fija nitrógeno gaseoso, como lo hacen algunas bacterias. Los hongos requieren una fuente de diversos minerales, particularmente fosfato, sulfato y sales de potasio y magnesio. También necesitan trazas de oligoelementos en forma de sales: boro, manganeso, cobre, molibdeno, hierro y cinc. Estos elementos son necesarios para el funcionamiento adecuado de varios enzimas metabólicos. Las levaduras presentan necesidades similares.

Los hongos tienen una gran importancia económica, no tan sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Los hongos son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva. Por otro lado, los hongos causan gran cantidad de enfermedades en plantas y animales y pueden destruir alimentos y materiales de los que de-

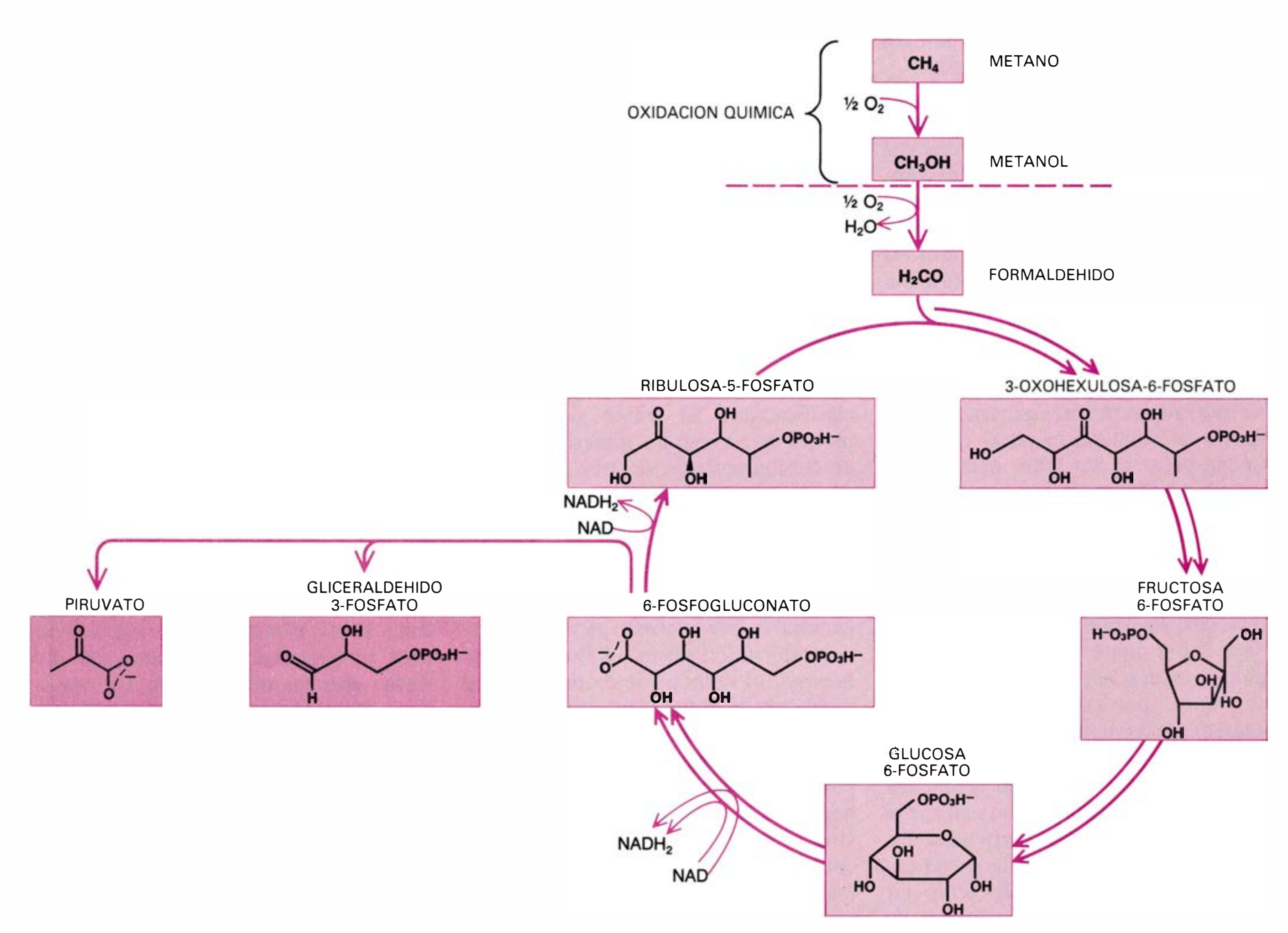
pende el hombre. Unos pocos ejemplos ilustrarán la magnitud de estos efectos. La enfermedad holandesa del olmo está causada por un ascomicete, *Ceratocystis ulmi*. Un hongo acuático ataca los peces y sus huevos en las piscifactorías. *Coccidioides immites*, un deuteromicete, es el responsable de la coccidiomicosis, o fiebre del valle de San Joaquín, en el hombre y en algunos animales. El ascomicete *Chaetomium*, degradador de la celulosa, destruye los tejidos de algodón.

Los hongos pueden también envenenar alimentos del hombre y piensos de animales. *Claviceps purpurea*, un ascomicete, sintetiza diversos alcaloides tóxicos, cuando parasita la planta del centeno, causando la enfermedad conocida como ergotismo. La ingestión de grano contaminado por ese hongo provoca abortos en el ganado. En los seres humanos, el ergotismo produce alucinaciones y puede ocasionar la muerte. Otra forma de intoxicación está causada por los hongos que secretan aflatoxinas en los piensos conservados en condiciones defectuosas, como la harina de cacahuete y el heno; un ejemplo de esto último lo tenemos en el hongo ascomicete *Aspergillus flavus*. Sus toxinas, que son metabolitos secundarios, resultan altamente carcinógenas. Las características venenosas de ciertas setas son perfectamente conocidas.

Los efectos perjudiciales de los hongos están contrarrestados por su utilización industrial. Los hongos son la base de muchas fermentaciones, como la hidrólisis del almidón de arroz que produce sake y la fermentación de varias combinaciones de soja, habichuelas, arroz y cebada, que dan lugar a los alimentos orientales miso, shoyu y tempeh. Los hongos son también la fuente de muchos enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas), ácidos orgánicos (cítrico, láctico), antibióticos (principalmente la penicilina), quesos especiales (Camembert, Roquefort) y, evidentemente, de las setas.

Volvamos de nuevo a los más simples de todos los microorganismos, los procariotas, y consideremos su estructura con un poco de detalle. Los procariotas carecen de núcleo organizado, vacuolas, mitocondrias y los sistemas membranosos presentes en levaduras, mohos y otros eucariotas. La célula procariótica tiene solamente dos sistemas internos principales: una molécula circular de ADN y un citoplasma no diferenciado donde se halla inmerso ese ADN. La longitud del anillo de ADN que codifica toda la información genética de la célula es superior a un milímetro, varios cientos de veces mayor que el tamaño máximo de muchas bacterias. El citoplasma contiene un gran número de ribosomas, gránulos constituidos por ARN y proteínas, que cumplen la función de enlazar los aminoácidos formando proteínas. Los ribosomas procariotas son más pequeños que los eucariotas.

Los microorganismos procarióticos poseen una envuelta celular muy dife-



CONVERSION DEL METANO EN PROTEINAS, que lleva a cabo la bacteria *Methylophilus methylotrophus*. Generalmente, el metano (CH_4) se oxida primero, con la ayuda de un catalizador, a metanol (CH_3OH), que sirve como sustrato para el crecimiento bacteriano. Los enzimas oxidan el metanol a formaldehído (HCHO), que se condensa con ribulosa 5-fosfato para formar 3-oxohexulosa-6-fosfato. Tras una serie de reacciones, los átomos de oxígeno y de carbono de tres moléculas de etanol se transforman en una molécula de piruvato (CH_3COCOO^-); la ribulosa-5-fosfato queda libre para empezar un nuevo ciclo. El piruvato es el punto de partida de los compuestos necesarios para el crecimiento, entre otros, de los aminoácidos, que formarán proteínas.

rente de la de los eucariotas. Las paredes celulares de casi todos los procariotas poseen un componente químico común, el peptidoglucano, que es el responsable de la forma y consistencia de la pared. El peptidoglucano es un extenso polímero que se halla integrado por subunidades alternas de *N*-acetilglucosamina (que es también el constituyente de la quitina en los eucariotas) y el ácido *N*-acetilmurámico. Esta última molécula es similar a la *N*-acetilglucosamina, pero tiene una unidad de ácido pirúvico unida al tercer átomo de carbono de la glucosa. El ácido pirúvico sirve como punto de unión de una cadena lateral lineal constituida por los aminoácidos L-alanina, D-glutámico, ácido diaminopimélico (un compuesto similar a un aminoácido) y D-alanina. Esta cadena lateral de cuatro unidades sirve para entrelazar las moléculas de peptidoglucano, formando una molécula gigante a modo de saco que rodea toda la célula.

La cantidad de peptidoglucano de la pared de las células bacterianas varía enormemente, desde más del 50 por ciento en la pared de las bacterias gram positivas hasta menos del 10 por ciento en las bacterias gram negativas. (El término gram positivo hace referencia a la capacidad de ciertas bacterias de retener el colorante cristal violeta; las bacterias gram negativas no lo retienen.) El contenido de peptidoglucano de las células se correlaciona con su sensibilidad a la penicilina, ya que este antibiótico interfiere con la biosíntesis del peptidoglucano. Esto explica por qué las bacterias gram positivas (que tienen un alto contenido en peptidoglucano) son mucho más sensibles a la penicilina que las bacterias gram negativas. Este hecho también justifica que sólo las células en fase de crecimiento sean sensibles a la penicilina: en presencia del antibiótico, la pared celular que se está levantando no puede acabarse y la célula muere. Otros antibióticos interfieren la biosíntesis de peptidoglucano de forma distinta.

En las bacterias gram negativas la capa interna de la pared celular es pobre en peptidoglucano y la capa externa rica en lipoproteína y lipopolisacáridos, los cuales constituyen más del 80 por ciento del peso seco de la pared. El componente lipopolisacárido es el principal responsable de lo que se conoce como especificidad antigénica O de las bacterias gram negativas. Cada cepa tiene alguna diferencia en el lipopolisacárido de su superficie, dependiendo de los azúcares particulares incorporados en los polímeros de la pared. Cuando los seres humanos u otros animales son infectados o inoculados con tales bacterias, el lipopolisacárido induce la formación de anticuerpos específicos. Con la ayuda de antisueros específicos se puede identificar la cepa bacteriana responsable de una infección concreta.

Muchos microorganismos procarióticos están dotados de orgánulos que les permiten moverse. Las estructuras más comunes son flagelos insertados en la superficie celular. Si los flagelos se encuentran concentrados en un extremo de la célula se denominan polares; si están distribuidos por toda la superficie celular, reciben el nombre de peritricos.



CELULAS HUMANAS (protuberancias alargadas situadas en la superficie de la esfera) de prepucio que se utilizan para la producción de interferón en los cultivos de tejidos, según una microfotografía electrónica de barrido. La esfera está constituida por un polímero sintético de dextrano; estas esferas se añaden al cultivo para proveer una superficie sobre la que puedan crecer las células. La micrografía, que aumenta 1100 veces el tamaño de la esfera, fue realizada por Don Siegel, de Harvard, y R. Fleischaker, del MIT.

Las células procarióticas presentan diversas morfologías: esférica, bacilar e incluso (en el caso de los actinomicetes) ramificada. Aunque algunas células procarióticas pueden igualar o exceder la longitud de ciertos microorganismos eucarióticos, el volumen celular de los procariotas es siempre menor. Las células procarióticas se multiplican asexualmente, casi siempre mediante la formación de un septo, o pared transversal, después de la replicación cromosómica. Los dos extremos de la célula, cada uno con un cromosoma, se dividen dando dos nuevas células. Algunas bacterias típicas (eubacterias) poseen endósporas, que son paquetes de ADN que pueden permanecer en estado latente por muchos años, y resultan altamente resistentes al calor (incluso al agua hirviendo), productos quimiotóxicos y otros agentes que ocasionan la muerte a las células vegetativas. En condiciones apropiadas, la endóspora puede dar origen a una nueva bacteria.

Aunque un pequeño número de microorganismos procarióticos puede realizar fotosíntesis mediante una clase especial de clorofila bacteriana, la mayoría de ellos, incluyendo los de importancia industrial, son heterótrofos, es decir, necesitan una fuente de nitrógeno y carbono asimilables, así como sales minerales, y, en algunos casos, factores orgánicos de crecimiento, como las vitaminas. Los procariotas de

utilidad industrial crecen en un sustrato orgánico que sirve tanto de fuente de carbono como de energía. Generalmente pueden sintetizar todos sus constituyentes celulares a partir de un único compuesto orgánico y de una fuente de nitrógeno. Algunas bacterias pueden fijar el nitrógeno gaseoso de la atmósfera, es decir, convertirlo en nitrógeno orgánico. Como ejemplo, tenemos las especies de *Azotobacter*, que vive libre en el suelo, y *Rhizobium*, que crece como simbionte en los nódulos radicales de las leguminosas. Un objetivo fundamental de los ingenieros agrónomos es encontrar un mecanismo para introducir los genes de fijación del nitrógeno de estas bacterias en las células de maíz y de otras plantas, cuyas necesidades de nitrógeno deben suplirse actualmente con fertilizantes.

En general, el metabolismo de los microorganismos procariotas está fuertemente influido por el oxígeno molecular. Los organismos que dependen de la respiración aeróbica, y para los que el oxígeno es el aceptor final de electrones, se conocen como aerobios estrictos. Un ejemplo de éstos es el productor de antibióticos *Streptomyces*. Por el contrario, para los organismos anaerobios estrictos el oxígeno es generalmente tóxico. Un grupo intermedio de organismos, los anaerobios facultativos, pueden crecer en presencia o en ausencia de oxígeno molecular. Estos organismos pueden subdividirse en dos grupos, según metabolicen el oxígeno de forma activa o únicamente lo toleren. Las bacterias del ácido láctico pertenecen al grupo que obtiene su energía exclusivamente de la fermentación, aunque estas bacterias no sufren lesión por parte del oxígeno. Por otro lado, las bacterias coliformes, como *Escherichia coli*, pueden obtener su energía de la fermentación o de la respiración.

Entre las bacterias, solamente un subgrupo, las eubacterias, tienen especies de interés industrial. Esas bacterias constituyen un grupo tan amplio y diversificado de microorganismos que un completo estudio taxonómico estaría fuera de lugar aquí. Por consiguiente, sólo se mencionarán unos pocos ejemplos de eubacterias explotadas por la industria. Las bacterias del ácido acético, representadas por los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*, son organismos gram negativos de forma bacilar que pueden convertir el etanol en ácido acético. *Gluconobacter* tiene flagelación polar y sólo oxida el etanol hasta ácido acético. *Acetobacter* posee flagelación peritrica y es capaz de oxidar el ácido acético que produce y dar así dióxido de carbono y agua.

ANTICUERPOS MONOCLONALES. Son anticuerpos ultrapurificados fabricados por células de hibridoma: obtenidas mediante fusión de linfocitos (glóbulos blancos) y células malignas de mieloma. En la parte superior, a la izquierda, se muestra un antígeno con cuatro determinantes antigénicos en su superficie. Cuando el antígeno se inyecta en un ratón, los linfocitos del ratón fabrican de forma independiente anticuerpos específicos contra los determinantes antigénicos. Por consiguiente, un antisuero preparado a partir de sangre de ratón contiene una mezcla de anticuerpos contra el antígeno. En la preparación de anticuerpos monoclonales, mostrada a la derecha, se extraen los linfocitos del bazo del ratón y se fusionan con células de mieloma. Las células híbridas pueden clonarse para producir anticuerpos puros.

Las bacterias aerobias formadoras de esporas están representadas por el género *Bacillus*, que tiene gran aplicación en las fermentaciones industriales. Todas las especies de *Bacillus* pueden formar endósporas y son gram positivas cuando las células son jóvenes. Casi todas las especies tienen flagelación peritrica. Algunas especies, como *Bacillus subtilis*, son aerobios estrictos; otras, como *B. thuringiensis*, pueden también llevar a cabo fermentaciones anaerobias. *B. subtilis* posee ciertas características que lo hacen atractivo para sustituir a *E. coli*, actualmente el organismo casi universal en las fermentaciones que utilizan ADN recombinante. Ciertos metabolitos secundarios elaborados por *B. subtilis* son excretados por la célula y, en consecuencia, fácilmente recuperables, mientras que los formados por *E. coli* permanecen en el interior de la célula y pueden obtenerse únicamente rompiendo ésta y aislando el producto deseado de entre los restos celulares. *E. coli* presenta también la desventaja de contener sustancias altamente tóxicas (endotoxinas) que deben eliminarse, con sumo cuidado, del producto de la fermentación. *B. subtilis* no fabrica esas endotoxinas.

Las bacterias anaerobias formadoras de esporas están representadas por especies del género *Clostridium*. Mientras que las células vegetativas de este género son muy sensibles al oxígeno, las endósporas están protegidas de su efecto letal. Las células, habitantes normales del suelo, son bacilos gram positivos con flagelación peritrica. Obtienen su energía metabólica a través de varias clases de fermentación. Ya se ha mencionado que *C. acetobutylicum* puede fermentar los azúcares dando acetona, etanol, isopropanol y butanol; otros sustratos fermentables por este grupo son el almidón, la pectina y diversos compuestos nitrogenados.

Las bacterias del ácido láctico incluyen, entre otras, las especies de los géneros *Streptococcus, Leuconostoc* y

Lactobacillus. Estos organismos, incapaces de formar endósporas, son gram positivos, inmóviles y con morfología bacilar o cocácea, que obtienen su energía de fermentaciones, pero no son sensibles al oxígeno. Las bacterias heterofermentativas del ácido láctico del género *Leuconostoc* convierten los carbohidratos en ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Las bacterias homofermentativas del ácido láctico del género *Streptococcus* producen sólo ácido láctico. Las especies de *Lactobacillus* fermentan los azúcares dando ácido láctico y varios productos más.

Otro procariota, *Corynebacterium glutamicum*, como ya se ha mencionado, es una importante fuente industrial de lisina (un aminoácido) y de nucleótidos-5' (utilizados como edulcorantes). Las bacterias corineformes tienden a tener morfología irregular; a veces son ramificadas y no simplemente en forma de maza (como sugiere la palabra griega *coryne*, maza). Las células generalmente son inmóviles, gram positivas e incapaces de formar endósporas. El género contiene especies que son patógenas para animales y plantas, pero existen también especies de interés industrial que habitan en el suelo y no son patógenas. Aunque las células son anaerobias facultativas, crecen mejor en condiciones aerobias. Las corinebacterias sintetizan el enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno.

Otro importante grupo de organismos procarióticos habitantes del suelo, los Actinomicetes, son aerobios estrictos con necesidades nutricionales simples. Incluyen muchos géneros cuyo desarrollo vegetativo es exclusivamente en forma de micelio. Son gram positivos y no forman endósporas. Sin lugar a dudas, el género más importante del grupo es *Streptomyces*, cuyas especies adquirieron gran importancia cuando se descubrió que excretaban antibióticos. El olor característico a tierra mojada se debe a compuestos volátiles fabricados por *Streptomyces*. Si los Actinomicetes se cultivan en medio sólido, no sólo forman un fino micelio ramificado, sino que también producen una hifa aérea que se diferencia en cadenas de conidiósporas. Cada conidióspora puede, a su vez, generar una microcolina micelial. Otro género de Actinomicetes es *Micromonospora*, algunas de cuyas especies también excretan antibióticos. Sus colonias carecen de micelio aéreo. En cambio, las conidiósporas se forman en los extremos de las cortas ramas hifales por toda la colonia.

Las células humanas se cultivaron por vez primera en el laboratorio a principios de este siglo. Hasta principios de la década de 1950 no se les encontró una significativa utilización industrial a los cultivos de tejidos. Se descubrió entonces que el virus de la poliomielitis podía multiplicarse en cultivos de tejidos de mono y de hombre, con objeto de fabricar vacunas. Desde entonces, el interés en las líneas celulares humanas ha aumentado enormemente con la aplicación de los cultivos celulares en el aislamiento y desarrollo de otros virus, en la producción de proteínas altamente específicas (como el interferón y los anticuerpos), en la investigación sobre el cáncer y en la quimioterapia antivírica.

Las células de los mamíferos son, evidentemente, eucarióticas y poseen generalmente una organización interna más compleja que las células de levaduras y hongos. Una diferencia fundamental entre las células de mamíferos y las de los microorganismos radica en que las primeras no poseen pared celular externa; su citoplasma está rodeado solamente por una fina membrana. Esta membrana plasmática regula la entrada de nutrientes necesarios para el crecimiento y la división, además de liberar los productos metabólicos de la célula. En los tejidos somáticos (los tejidos que no se dedican a la reproducción), las células son diploides y se dividen por mitosis. Una constricción de las membranas sirve para dividir las células en dos. La división celular requiere unas 24 horas, a diferencia de la hora o dos horas de las levaduras y de los 20 o 60 minutos de las bacterias. Normalmente, las células de los mamíferos están dispuestas en estructuras tridimensionales como los órganos y músculos, pero cuando crecen en cultivos de tejidos pueden flotar o formar una capa de tan sólo una célula de espesor.

Los requerimientos nutritivos de las células de mamífero son bastante más complejos que los de los microorganismos eucariotas. Necesitan una mezcla de aminoácidos para la síntesis de proteínas, así como purinas y pirimidinas para la síntesis de ácidos nucleicos. El medio de cultivo, que debe hacerse con agua desionizada muy pura, requiere glucosa como fuente de carbono y energía, una mezcla de vitaminas y una mezcla equilibrada de sales minerales para mantener las células a la presión osmótica adecuada, así como para tamponar el medio al *p*H óptimo (alrededor de 7,2). El medio debe contener también pequeñas cantidades de antibióticos para evitar una posible infección bacteriana, además de un 5 a un 20 por ciento de suero sanguíneo (humano o bovino fetal). En algunos casos, proteínas específicas del suero pueden reemplazar satisfactoriamente al suero completo si se requiere un medio libre sin éste. Para un crecimiento óptimo, el cultivo debe mantenerse a 37 grados Celsius. Por debajo de los 36 grados las células se dividen muy lentamente, e incluso pueden no hacerlo; a temperaturas superiores a los 38 grados, mueren. La mayoría de las líneas celulares animales, incluyendo las humanas, pueden conservarse indefinidamente si se enfrían lentamente hasta −180 grados. Para la conservación en congeladores se necesitan medios especiales.

Las líneas celulares de mamíferos se obtienen generalmente a partir de tejidos embrionarios. El procedimiento usual consiste en obtener una suspensión de células individuales tratando un dispersado del tejido con el enzima digestivo tripsina. Si se deja sedimentar una suspensión de células en un medio nutritivo en la parte plana de un frasco de cultivo, las células se dividen y forman una monocapa. Cuando el crecimiento alcanza su etapa final, puede empezarse el subcultivo, extrayendo cuidadosamente masas u hojas de células. Algunos tipos de células crecen también en suspensión. La técnica más frecuentemente empleada consiste en utilizar botellas cilíndricas, que giran lentamente sobre su eje longitudinal. Puede aumentarse la producción de células añadiendo a la suspensión pequeñas esferas de polímeros sintéticos inertes. También se han obtenido cultivos líquidos de más de 1000 litros en vasijas con agitación.

Un pequeño número de proteínas y polipéptidos utilizados en terapéutica, como la insulina humana y la somatostatina (una cadena peptídica de sólo 14 aminoácidos), se están obteniendo de células bacterianas, fundamentalmente de *E. coli*, en las que se ha introducido por técnicas de ingeniería genética el gen que codifica el producto deseado. La separación de estas proteínas de las proteínas microbianas y de otros constituyentes celulares, muchos de ellos de elevada toxicidad, presenta grandes dificultades. La eliminación de proteínas extrañas puede evitarse, o simplificarse, recurriendo a líneas celulares de mamíferos (incluso humanas) modificadas para aumentar su productividad.

Una proteína que se está fabricando a un nivel considerable (si bien todavía en el laboratorio) a partir de líneas celulares de mamíferos es el agente antivírico denominado interferón. Existen muchas clases de interferón; no nos re-

ORGANISMO	CLASE	PRODUCTO
ALIMENTOS Y BEBIDAS		
Saccharomyces cerevisiae	LEVADURA	LEVADURA PARA PAN, VINO, CERVEZA ALE Y SAKE
Saccharomyces carlsbergensis	LEVADURA	CERVEZA LAGER
Saccharomyces rouxii	LEVADURA	SALSA DE SOJA
Candida milleri	LEVADURA	PAN FRANCES ACIDO
Lactobacillus sanfrancisco	BACTERIA	PAN FRANCES ACIDO
Streptococcus thermophilus	BACTERIA	YOGUR
Lactobacillus bulgaricus	BACTERIA	YOGUR
Propionibacterium shermanii	BACTERIA	QUESO SUIZO
Gluconobacter suboxidans	BACTERIA	VINAGRE
Penicillium roquefortii	HONGO	QUESOS CON VETAS AZULES
Penicillium camembertii	HONGO	QUESOS CAMEMBERT Y BRIE
Aspergillus oryzae	HONGO	SAKE (HIDROLISIS DEL ALMIDON DEL ARROZ)
Rhizopus	HONGO	TEMPEH
Mucor	HONGO	*SUFU* (REQUESON DE SOJA)
Monascus purpurea	HONGO	ANG-KAK (ARROZ ROJO)
PRODUCTOS QUIMICOS INDUSTRIALES		
Saccharomyces cerevisiae	LEVADURA	ETANOL (A PARTIR DE LA GLUCOSA)
Kluyveromyces fragilis	LEVADURA	ETANOL (A PARTIR DE LA LACTOSA)
Clostridium acetobutylicum	BACTERIA	ACETONA Y BUTANOL
Aspergillus niger	HONGO	ACIDO CITRICO
Xanthomonas campestris	BACTERIA	POLISACARIDOS
AMINOACIDOS Y NUCLEOTIDOS QUE DAN SABOR		
Corynebacterium glutamicum	BACTERIA	L-LISINA
Corynebacterium glutamicum	BACTERIA	ACIDOS 5'-INOSINICO Y 5'-GUANILICO
PROTEINA UNICELULAR		
Candida utilis	LEVADURA	PROTEINA MICROBIANA A PARTIR DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA PULPA DEL PAPEL
Saccharomycopsis lipolytica	LEVADURA	PROTEINA MICROBIANA A PARTIR DE ALCANOS DEL PETROLEO
Methylophilus methylotrophus	BACTERIA	PROTEINA MICROBIANA A PARTIR DEL CRECIMIENTO EN METANO O METANOL
VITAMINAS		
Eremothecium ashbyi	LEVADURA	RIBOFLAVINA
Pseudomonas denitrificans	BACTERIA	VITAMINA B_{12}
Propionibacterium	BACTERIA	VITAMINA B_{12}
ENZIMAS		
Aspergillus oryzae	HONGO	AMILASAS
Aspergillus niger	HONGO	GLUCAMILASA
Trichoderma reesii	HONGO	CELULASA
Saccharomyces cerevisiae	LEVADURA	INVERTASA
Kluyveromyces fragilis	LEVADURA	LACTASA
Saccharomycopsis lipolytica	LEVADURA	LIPASA
Arpergillus	HONGO	PECTINASAS Y PROTEASAS
Bacillus	BACTERIA	PROTEASAS
Endothia parasitica	HONGO	CUAJO MICROBIANO
POLISACARIDOS		
Leuconostoc mesenteroides	BACTERIA	DEXTRANO
Xanthomonas campestris	BACTERIA	PASTA DE XANTANO
PRODUCTOS FARMACEUTICOS		
Penicillium chrysogenum	HONGO	PENICILINAS
Cephalosporium acremonium	HONGO	CEFALOSPORINA
Streptomyces	BACTERIA	AMFOTERICINA *B*, KANAMICINAS, NEOMICINAS, ESTREPTOMICINA, TETRACICLINAS Y OTROS
Bacillus brevis	BACTERIA	GRAMICIDINA *S*
Bacillus subtilis	BACTERIA	BACITRACINA
Bacillus polymyxa	BACTERIA	POLIMIXINA *B*
Rhizopus nigricans	HONGO	TRANSFORMACION DE ESTEROIDES
Arthrobacter simplex	BACTERIA	TRANSFORMACION DE ESTEROIDES
Mycobacterium	BACTERIA	TRANSFORMACION DE ESTEROIDES
HIBRIDOMAS	—	INMUNOGLOBULINAS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES
LINEAS CELULARES DE MAMIFEROS	—	INTERFERON
Escherichia coli (mediante técnicas de ADN recombinante)	BACTERIA	INSULINA, HORMONA HUMANA DEL CRECIMIENTO, SOMATOSTATINA, INTERFERON
CAROTENOIDES		
Blakeslea trispora	HONGO	BETA-CAROTENO
Phaffia rhodozyma	LEVADURA	ASTAXANTINA
BACTERIAS ENTOMOPATOGENAS		
Bacillus thuringiensis	BACTERIA	BIOINSECTICIDAS
Bacillus popilliae	BACTERIA	BIOINSECTICIDAS

PRINCIPALES PRODUCTOS industriales obtenidos con la ayuda de los microorganismos. Abarcan desde los más antiguos (cerveza, queso y pan) hasta las más modernas creaciones de la ingeniería genética (la insulina, hormona humana del crecimiento). La tecnología celular se ha ampliado ahora con la inclusión de los cultivos de células de mamíferos como fuente de nuevos productos.

ferimos tan sólo a los de diferentes especies de mamíferos sino también a diferentes interferones de la misma especie. Uno de los problemas principales que ha tenido que resolverse para la obtención del interferón a partir de líneas celulares es la concentración, extremamente baja, que fabrican las células. El proceso de producción empieza con el crecimiento de una determinada línea celular en un medio nutritivo durante aproximadamente una semana. En esta etapa se sintetiza poco interferón, o prácticamente nada. El medio de crecimiento se sustituye entonces por un medio inductor, que suele albergar una mezcla de ARN poliinosina-citosina (un ARN bicatenario sintético) y dietil-aminoetil-dextrano. Los dos compuestos inducen en las células la síntesis de interferón. Antes de que las células empiecen a excretar el interferón, el medio se sustituye una vez más por un medio con sustancias adicionales (como insulina y fosfato de guanosina o bajas concentraciones de albúmina sérica), pues se ha observado que aumentan la producción de interferón o su estabilidad. Finalmente, el medio se recoge, se concentra, dializa y liofiliza.

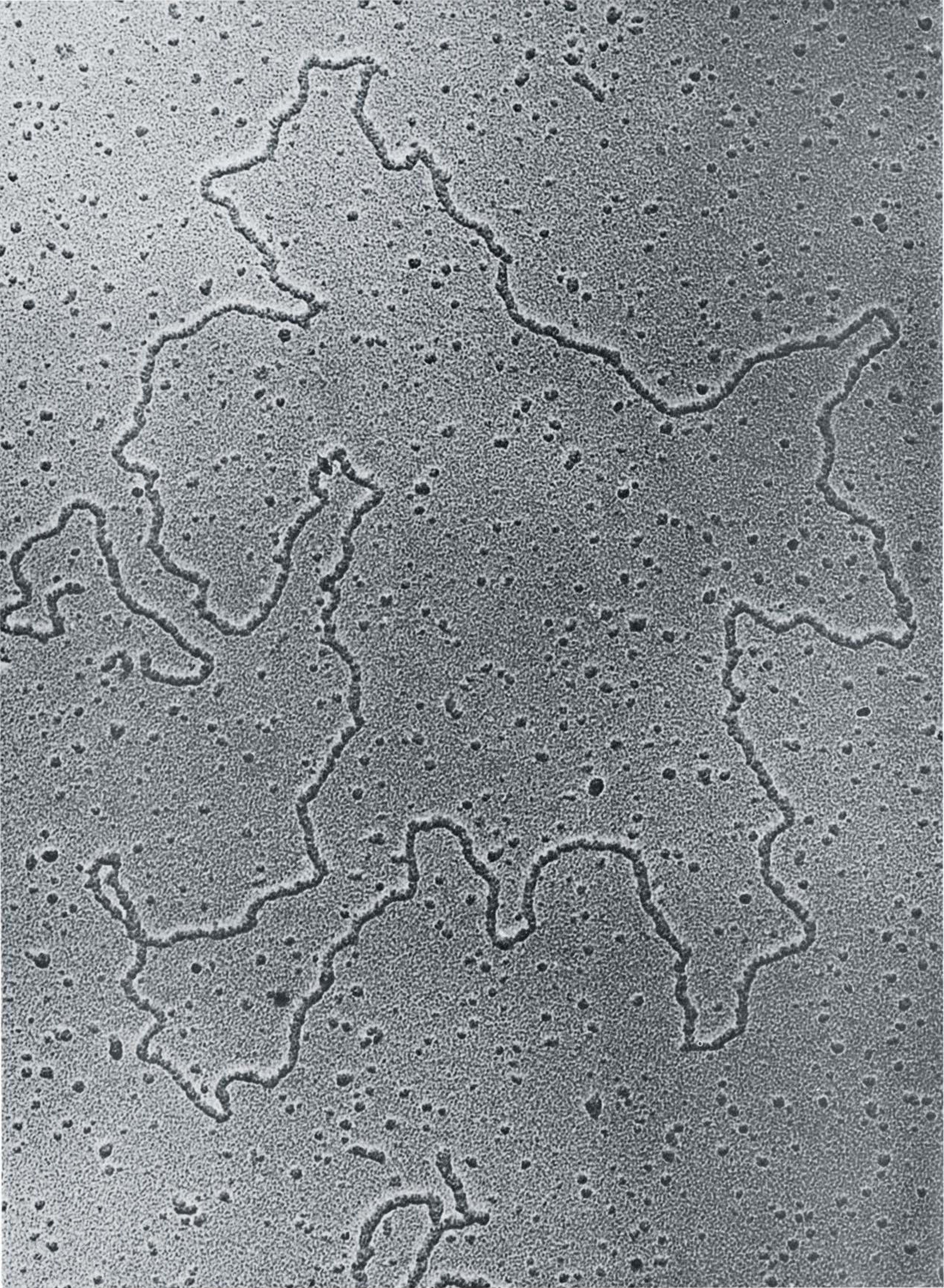
El material resultante contiene sólo alrededor del 0,1 por ciento de interferón puro; han de emplearse, pues, otros métodos de purificación. Uno de los más efectivos y específicos es la cromatografía de inmunoafinidad. Anticuerpos monoclonales con afinidad por un tipo particular de interferón pueden unirse a las esferas de polisacárido con las que se rellena una columna de vidrio. Cuando la solución cruda de interferón se hace pasar a través de la columna, las moléculas de interferón se adsorben a las esferas, mientras que las impurezas atraviesan la columna. El interferón se libera de las esferas y se eluye de la columna alterando el *p*H de ésta con una disolución adecuada. En un solo pase por la columna la actividad del interferón puede aumentarse 5000 veces.

Sólo recientemente los anticuerpos monoclonales han sido asequibles en cantidades importantes, gracias al empleo de técnicas en las que células normales de mamífero se han hibridado con células de mielomas de tumores

malignos del sistema inmunitario. El sistema inmunitario normal es capaz de fabricar como mínimo un millón de clases diferentes de anticuerpos para combatir e inactivar proteínas extrañas u otros antígenos que invaden el cuerpo. Una célula maligna de mieloma, en cambio, sintetiza solamente un tipo único de anticuerpo, una proteína inmunoglobulínica que puede ser una cualquiera de las casi innumerables proteínas posibles. Las células de mieloma proliferan rápidamente y pueden cultivarse indefinidamente a partir de una sola célula. Sin embargo, no pueden ser inducidas a sintetizar anticuerpos contra un antígeno específico.

Esta dificultad se superó en 1975, cuando Cesar Milstein y sus colaboradores, del Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council de Cambridge, Inglaterra, concibieron la idea de fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos *B* del bazo de un ratón inmunizado con un antígeno específico. Las células del "hibridoma" resultante, o mieloma híbrido, tenían las propiedades de las dos células precursoras: la inmortalidad y la capacidad de excretar grandes cantidades de un único tipo específico de anticuerpo. De todos modos, todavía habrá que trabajar en muchos detalles de la selección de células híbridas, incluyendo las propiedades genéticas de las células animales híbridas.

El trabajo de Milstein ha abierto una nueva era de la inmunología experimental. Los problemas asociados anteriormente con los heteroantisueros, es decir, sueros que contienen mezclas de anticuerpos, pueden ahora superarse. En 1980, Carlo M. Croce y sus colaboradores, en el Instituto Wistar de Anatomía y Biología de Filadelfia, consiguieron producir un hibridoma humano intraespecífico estable mediante la fusión de linfocitos *B* de un paciente de mieloma múltiple con linfocitos periféricos de un enfermo con panencefalitis subaguda. Se vio que las células del hibridoma de esta fusión excretaban moléculas de la inmunoglobulina humana *M* específica contra componentes del virus del sarampión. Aunque solamente un número limitado de líneas celulares humanas permiten la fabricación de hibridomas que excreten de forma activa anticuerpos específicos, el trabajo de Croce apunta la posibilidad de obtener células *B* humanas híbridas que sinteticen continuamente anticuerpos contra múltiples virus patógenos. Las posibilidades futuras para mejorar la inmunoterapia humana son, pues, muy grandes.



Programación genética de microorganismos industriales

Los productos útiles elaborados por los microorganismos están determinados por los genes, sujetos, por su parte, a una selección intensiva y, en la actualidad, a la invertención directa del hombre

David A. Hopwood

Un microorganismo es una máquina perfectamente coordinada, cuya evolución ha estado dirigida hacia la consecución de sus propios objetivos: la supervivencia y la reproducción. Una bacteria o una célula de levadura de "tipo silvestre" se han adaptado, mediante selección natural, a su ambiente y a la competencia con otras especies, pero no así a la elaboración de algunas substancias cuya producción busca el hombre. La moderna industria microbiológica trata de seleccionar o construir organismos extraños, programados genéticamente para fabricar un producto metabólico normal en cantidades que supondrían un agotamiento desastroso de los recursos energéticos y nutritivos de un organismo silvestre o bien un producto que no forma parte de su repertorio normal.

Los primeros pasos en el control y mejora de los procesos microbiológicos sólo se empezaron a dar hace poco más de cien años, y consistieron en el aislamiento y desarrollo, en cultivo puro, de las bacterias y hongos que intervenían en la formación de productos útiles. Con ello, fue posible seleccionar cepas especialmente preparadas para una tarea concreta.

El cultivo de cepas industriales especiales sólo se logró unos años más tarde, cuando ya se tenía algún conocimiento de la genética microbiana. Primero vino el descubrimiento de algunos mecanismos de la mutación, proceso mediante el cual un gen (unidad de información hereditaria) sufre un cambio repentino del que resulta una forma nueva. La inducción de mutaciones en el laboratorio, por medio de rayos X, se consiguió por primera vez en 1927. A partir de 1945, el descubrimiento de una amplia gama de otras potentes radiaciones mutagénicas y de mutágenos químicos puso en manos de los microbiólogos una poderosa serie de instrumentos para introducir cambios en la composición genética de sus cultivos. Mediada la década de los cuarenta, se produjeron otros avances que hicieron posible reordenar la información genética por medio de la recombinación de genes de dos o más organismos: se encontraron bacterias que se reproducían sexualmente tras una forma extraña de apareamiento, se consiguió el intercambio de ADN desnudo y se descubrieron nuevos sistemas genéticos en los hongos. La profundización en el conocimiento de estos procesos inició el explosivo avance de la genética microbiana y la biología molecular, que continúa, más acelerado aún, en nuestros días.

En los años posteriores a la segunda guerra mundial, la industria microbiológica experimentó cambios importantes, tanto en sus posibilidades como en el volumen de su producción, a raíz de la fabricación industrial de antibióticos. La penicilina se había ya elaborado durante la guerra, y a ella siguió una lista creciente de nuevos antibióticos, efectivos contra una amplia gama de enfermedades bacterianas y fúngicas. Después, se desarrollaron nuevos procesos, en los que los microorganismos producían otras substancias químicas puras: aminoácidos (los componentes de las proteínas) y nucleótidos (los componentes del ADN). Pero la elaboración de estas substancias a partir de organismos silvestres no resultaba económicamente rentable. Su producción industrial dependía de manipulaciones genéticas, por lo que se registró un desarrollo paralelo de la industria microbiológica y de la nueva ciencia de la genética microbiana. Pasó largo tiempo (para desencanto de algunos investigadores) en que las contribuciones significativas de la ciencia de la genética a la programación de microorganismos industriales constituyeron la excepción, no la regla.

La situación cambió de manera espectacular en 1973, al anunciarse la realización de experimentos con ADN recombinante y clonación molecular. Se desarrollaron nuevas técnicas que permitirían (en principio) transferir genes de cualquier origen a cualquier microorganismo. Estas técnicas de ingeniería genética constituyen poderosos instrumentos de laboratorio para revelar la estructura y función de los genes y poseen un inmenso potencial para el desarrollo de cepas de microorganismos industriales, capaces de dar productos tan nuevos como la insulina humana o la hormona del crecimiento, y también para el desarrollo racional de cepas nuevas más adecuadas para fabricar productos tradicionales. La ingeniería genética ha cautivado la imaginación de los directivos y empresarios industriales, pero se trata solamente de la cima del edificio de la genética microbiana construido a lo largo de los últimos treinta y cinco años. Esta es sólo una (aunque la más estimulante) de las numerosas facetas de la pro-

PLASMIDO aislado de una bacteria, aumentado 115.000 veces en la micrografía electrónica de la página opuesta. Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de ADN que no están integradas en el cromosoma bacteriano. Desempeñan una importante función en la programación genética de los microorganismos, ya que pueden transferirse de una cepa a otra (incluso de especies diferentes) y servir de vectores para introducir información genética completamente nueva en las bacterias mediante técnicas de ADN recombinante. Este plásmido fue aislado de *Streptomyces coelicolor* por Mervyn Bibb, en el laboratorio del autor, y se sombreó con platino, para exagerar su grosor; la doble hélice del ADN tiene aproximadamente 10 micrometros de circunferencia y comprende alrededor de 30.000 pares de bases de ADN.

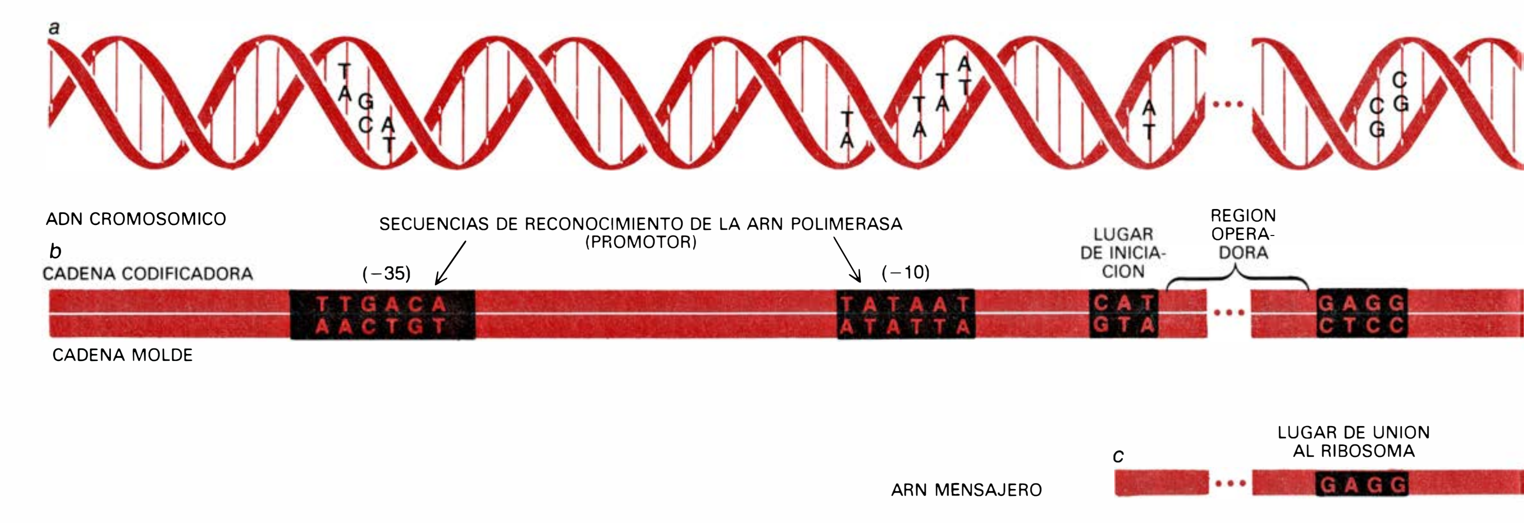
gramación genética de microorganismos industriales.

Las células vivas almacenan la información genética en las moléculas de ADN. En una bacteria típica, el conjunto básico está codificado en una molécula de ADN larga y enmarañada: el cromosoma bacteriano. Se trata de una doble hélice, formada por dos cadenas de nucleótidos. Cada nucleótido viene caracterizado por una de entre estas cuatro bases: adenina (*A*), guanina (*G*), timina (*T*) y citosina (*C*). Las bases son complementarias; es decir, en una cadena la adenina se empareja con una timina de la otra cadena, en tanto que la guanina lo hace con una citosina. La molécula es un círculo cerrado de, al menos, un milímetro de longitud (estrechamente plegado para caber en el interior de una célula bacteriana, quizá de una milésima de milímetro de diámetro) que consta de varios millones de pares de bases. La información total de la bacteria se despliega en un conjunto de varios miles de "genes estructurales" (cada uno con aproximadamente unos 1000 pares de bases) que determinan un número equivalente de proteínas, principalmente enzimas. La información está codificada en la secuencia de bases de una cadena de ADN. Cada "codón", de tres bases, especifica uno de los 20 aminoácidos; un gen estructural dirige la maquinaria celular en el ensamblaje de varios cientos de unidades de aminoácidos en una secuencia lineal determinada para formar una proteína.

No todo el ADN posee esta función codificadora. Las secuencias de bases adyacentes a los genes estructurales controlan su expresión; consiste ésta en su transcripción en un ARN mensajero complementario al molde de ADN y la traducción de ese ARN mensajero en proteínas, proceso este último que ocurre en los orgánulos celulares llamados ribosomas. Dos son las regiones de control que regulan la transcripción. Una es el promotor, breve secuencia que permite que el enzima ARN polimerasa se una al ADN y se desplace a lo largo de él, iniciando así la transcripción en ARN de la cadena codificadora en un punto anterior al comienzo del gen estructural; la otra región de control es una señal para terminar la transcripción, situada al final del gen estructural. En los genes que responden a la concentración de determinados metabolitos presentes en la célula (o en el medio de cultivo) existen sitios adicionales, en las regiones promotoras y de terminación, que interaccionan con unas proteínas reguladoras que se unen al ADN. Por ejemplo, a una secuencia "operadora" situada entre el promotor y el gen estructural puede unirse una proteína "represora", producto de un gen regulador específico; el enlace de un represor, quizá sólo en presencia de un metabolito particular, impide la transcripción de un gen estructural. Otras secuencias, transcritas a ARN mensajero, controlan la traducción. Un "lugar de enlace ribosómico" fija el ARN en el ribosoma, permitiendo que la traducción empiece en una señal de "inicio", el primer codón del gen estructural. Una señal de "fin", al acabar el gen, permite la liberación de la cadena proteínica completada.

Toda programación genética racional se basa en una clara comprensión de estas características del ADN y de sus diferencias en distintos organismos. Los cambios dentro de una región de codificación, por ejemplo, pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un enzima y, en consecuencia, afectar su actividad. Pequeñas alteraciones en la secuencia promotora pueden aumentar la probabilidad de que la ARN polimerasa se una al promotor, intensificando así la velocidad de transcripción. Las mutaciones en las regiones operadoras o en el gen regulador pueden impedir el enlace de un represor y, consecuentemente, aumentar (desreprimir) la transcripción. Además, los genes trasplantados de un organismo a otro no relacionado con él sólo se expresarán si los promotores y los lugares de unión al ribosoma de ambos organismos son suficientemente parecidos.

En los procariotas (bacterias) y euca-



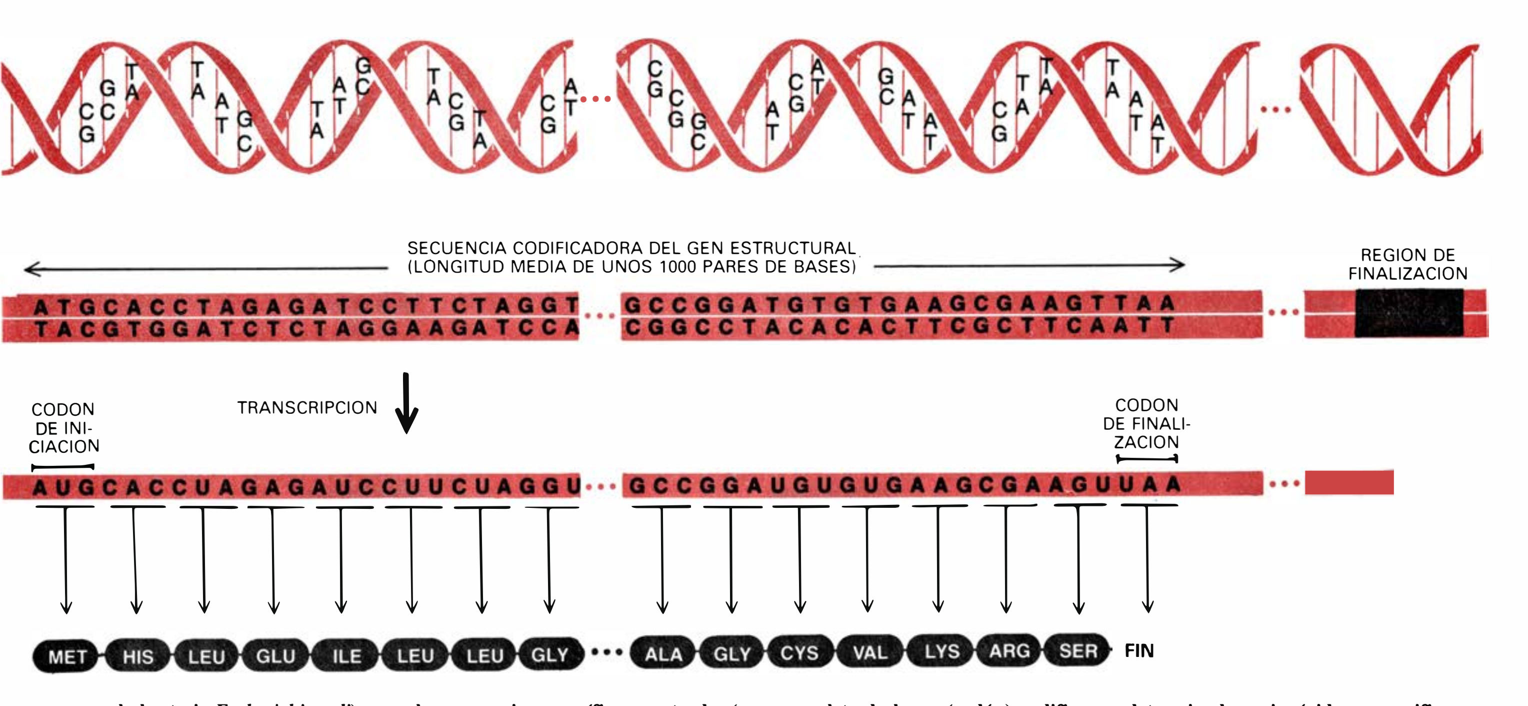
LA INFORMACION GENETICA se almacena en la doble hélice de ADN (*a*). Cada hebra de la hélice es una cadena de nucleótidos, que constan de un azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato y forman el esqueleto de la cadena, así como una de estas cuatro bases: adenina (*A*), guanina (*G*), timina (*T*) y citosina (*C*). La información está codificada en la secuencia de bases a lo largo de la cadena. La complementariedad de las bases (*A* se aparea siempre con *T* y *G* con *C*) constituye el fundamento de la replicación del ADN, de generación en generación, y de su expresión (mostrada aquí para el ADN bacteriano) en proteínas. La expresión se inicia con la transcripción de la secuencia de bases del ADN (*b*) en una cadena de ARN mensajero (*c*), que se corresponde con la cadena codificadora del ADN, salvo en que el uracilo (*U*) substituye a la timina. La transcripción en ARN y la traducción a proteína están reguladas por secuencias especiales (*color negro*) del ADN y ARN, respectivamente. El enzima transcriptor, la ARN polimerasa, se une a una región promotora que (en

riotas (todos los organismos superiores, de las algas al hombre) la clave genética y la bioquímica esencial de transcripción y traducción son las mismas, pero no así las señales de control. Lo mismo ocurre con la organización y expresión del ADN. En los eucariotas, el ADN forma un complejo con proteínas y está dividido en un número discreto de cromosomas, reunidos en el interior de un núcleo rodeado por una membrana. Organismos eucarióticos tales como los hongos poseen quizá diez veces más ADN que las bacterias; las plantas y animales superiores poseen miles de veces más. El incremento del contenido en ADN es muy superior al que correspondería por el aumento del número de genes, en parte debido a que en los eucariotas muchos genes tienen intercaladas unas secuencias no codificadoras ("intrones") localizadas dentro de los genes estructurales. Los intrones se transcriben junto con las secuencias codificadoras ("exones"), pero no se expresan; son eliminados por un proceso de corte y empalme que junta los exones de un gen para formar el ARN mensajero maduro que se traduce en proteína. Aunque raros en los genes de hongos, los intrones están presentes en la mayoría de organismos eucarióticos superiores. Su presencia complica la manipulación del ADN recombinante, ya que las bacterias carecen de los enzimas necesarios para eliminarlos del transcrito de ARN primario; así pues, un gen eucariótico con intrones no podrá expresarse en las bacterias.

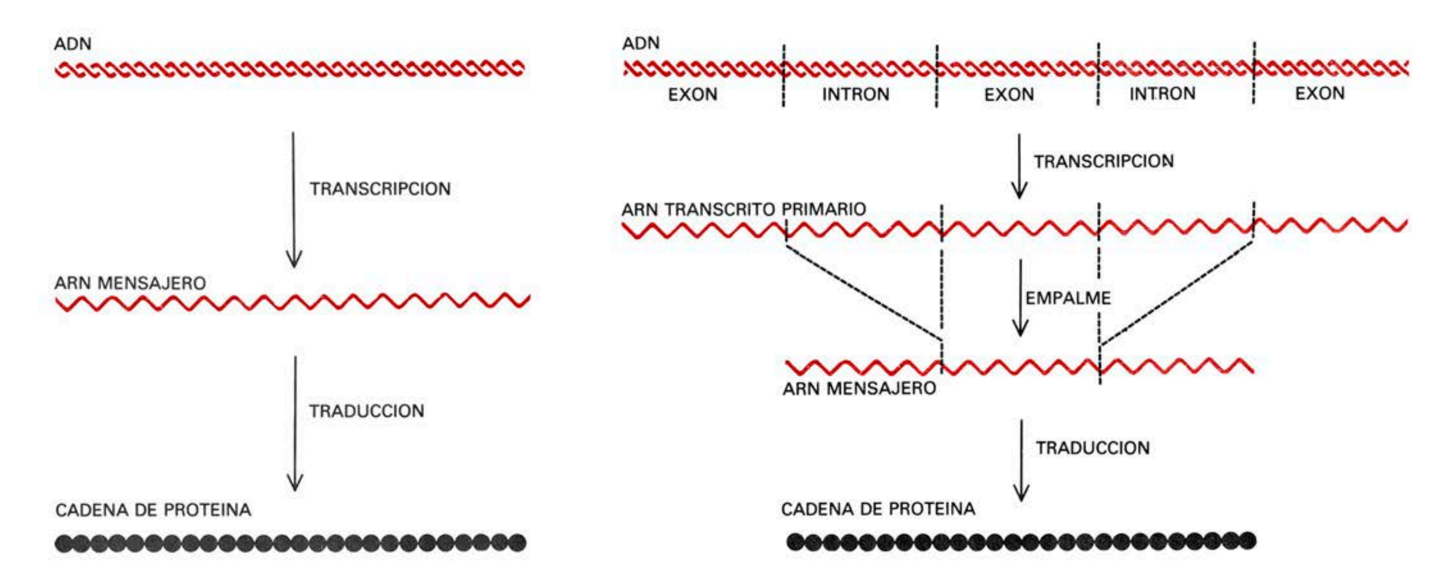
El desarrollo de un microorganismo industrial diseñado a medida, partiendo de una bacteria u hongo silvestre, exige cambios en la información genética que eliminen las propiedades no deseables, incrementen las adecuadas o introduzcan otras completamente nuevas. Existen diversas formas de realizar tales cambios. Una es aprovecharse de las mutaciones espontáneas, o bien inducirlas. El tipo más sencillo de mutación es la puntual, es decir, el cambio de un par de bases (digamos adenina-timina) por otro (guanina-citosina). En otros casos, puede suprimirse un par de bases o un corto segmento de ADN de la secuencia, o también puede insertarse un par de bases. Todos estos cambios ocurren de manera natural en cualquier ADN, probablemente como resultado de errores en su replicación de una generación a otra, pero las mutaciones espontáneas son raras y sólo afectan a un determinado par de bases, aproximadamente una vez cada 100 millones de replicaciones. Hasta por mil, al menos, puede multiplicarse la frecuencia de mutación exponiendo los microorganismos a mutágenos, tales como radiaciones ultravioleta, ionizantes (rayos X, rayos gamma o neutrones) y a una amplia gama de compuestos químicos, aparentemente dispares, que pueden reaccionar con las bases del ADN o interferir en la replicación de éste.

Los mutágenos interaccionan con los genes al azar. Cada agente puede actuar específicamente sobre una base o grupo de bases particular (por ejemplo, la radiación ultravioleta tiende a enlazar dos timinas adyacentes en la misma cadena de ADN), pero todos los genes son cadenas de los mismos cuatro tipos de bases. Así pues, resulta imposible, por norma, provocar una mutación preferentemente sobre un gen determinado (aunque, en cualquier gen, ciertos tratamientos tiendan a causar mutaciones principalmente en determinadas posiciones). Para mejorar una cepa mediante mutaciones debe recurrirse a pruebas sensibles que permitan reconocer los escasos mutantes que poseen una característica deseada.

Hay procedimientos muy directos. Por ejemplo, para seleccionar mutantes resistentes a un compuesto químico que inhibe el crecimiento de las cepas no mutadas pueden sembrarse millones de células de la cepa inicial sobre una placa de cultivo que contenga el inhibidor. Unicamente los mutantes resistentes proliferarán y formarán colonias. Otros tipos de mutantes sólo pueden hallarse ensayando al azar las propiedades de colonias en cultivos individuales o incluso en pequeñas versiones de fermen-



la bacteria *Escherichia coli*) posee las secuencias específicas mostradas (o variaciones menores de ellas), alrededor de 10 pares de bases y 35 pares de bases antes del lugar de iniciación de la transcripción. Detrás del final del gen estructural, una región de terminación determina que la polimerasa cese la transcripción. En algunos genes, una secuencia operadora, que puede enlazar una molécula represora, proporciona un control adicional. El ARN mensajero se traduce en unos orgánulos celulares denominados ribosomas. Cada triplete de bases (codón) codifica un determinado aminoácido y especifica su incorporación en la cadena proteínica en crecimiento. Un lugar de enlace ribosómico en el ARN permite que la traducción comience en un codón de "iniciación", que es siempre *AUG*, y corresponde al aminoácido metionina (*Met*). La traducción prosigue su curso hasta que se alcanza el codón de "finalización" (*UAA* es una de las tres posibilidades), que señala el término de la traducción y la separación del ribosoma de la cadena proteínica completada.



EL ADN SE EXPRESA en los procariotas (bacterias) de un modo distinto que en los eucariotas (organismos superiores). En los primeros, la información genética, codificada en un segmento continuo de la doble hélice del ADN que constituye un gen estructural, se transcribe directamente en ARN mensajero, cuya traducción da lugar a una proteína. En los organismos eucarióticos, por otro lado, algunos genes estructurales (la mayoría de ellos en eucariotas superiores) están divididos: las secuencias codificadoras ("exones") están separadas por secuencias no codificadoras intercaladas ("intrones"). El gen entero se transcribe en ARN primario. Después, los transcritos intrónicos se eliminan y los exónicos se empalman, constituyéndose el ARN mensajero maduro.

a
METABOLISMO CENTRAL
ACIDO ASPARTICO
ASPARTATO KINASA
ACIDO FOSFOASPARTICO
RETRO-INHIBICION
SEMIALDEHIDO ASPARTICO
HOMOSERINA DESHIDRO-GENASA
LISINA
HOMOSERINA
TREONINA
METIONINA

b
METABOLISMO CENTRAL
ACIDO ASPARTICO
ASPARTATO KINASA
ACIDO FOSFOASPARTICO
SEMIALDEHIDO ASPARTICO
HOMOSERINA DESHIDRO-GENASA
LISINA
HOMOSERINA
TREONINA
METIONINA

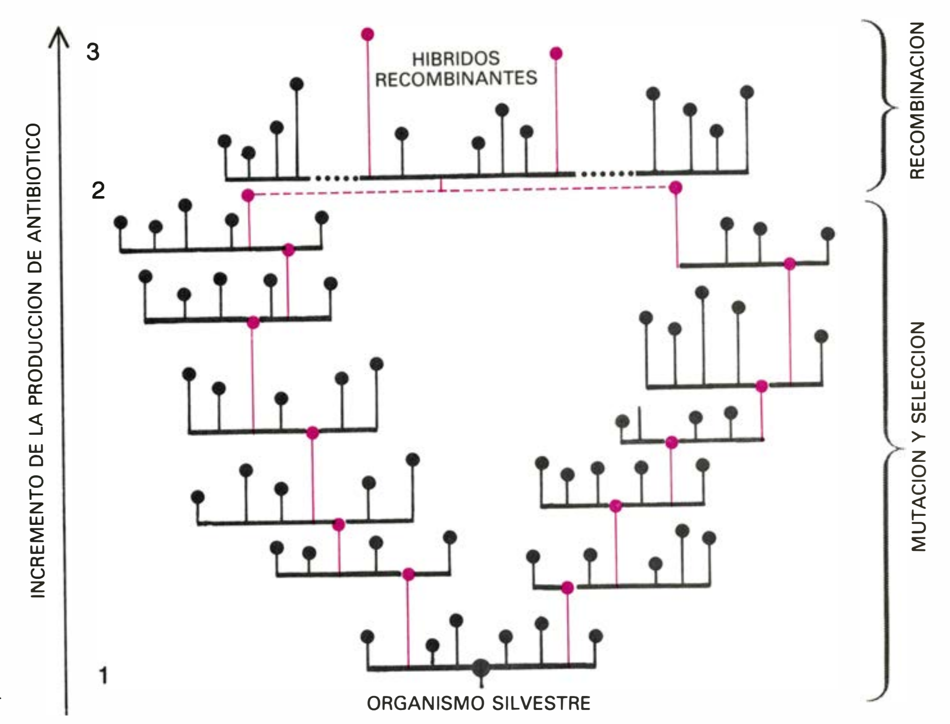
c
METABOLISMO CENTRAL
ACIDO ASPARTICO
ASPARTATO KINASA
ACIDO FOSFOASPARTICO
SEMIALDEHIDO ASPARTICO
HOMOSERINA DESHIDRO-GENASA
LISINA
HOMOSERINA
TREONINA
METIONINA

POR REPROGRAMACION MUTACIONAL se producen cepas bacterianas que fabrican grandes cantidades del aminoácido esencial lisina. En cepas de tipo silvestre (*a*) la lisina resulta, junto con los aminoácidos treonina y metionina, de una vía ramificada controlada primariamente por retroinhibición: la actividad del enzima aspartato kinasa se inhibe por la acción conjunta de los excesos de lisina y treonina. De este control se salvan dos clases de cepas mutantes. En una de ellas (*b*), una mutación inactiva el enzima homoserina deshidrogenasa, impidiendo por tanto que la treonina se acumule e inhiba la aspartato kinasa. En la otra (*c*), ha mutado el propio gen de la aspartato kinasa, que no resulta inhibido por la lisina, aun cuando ésta se halle en exceso.

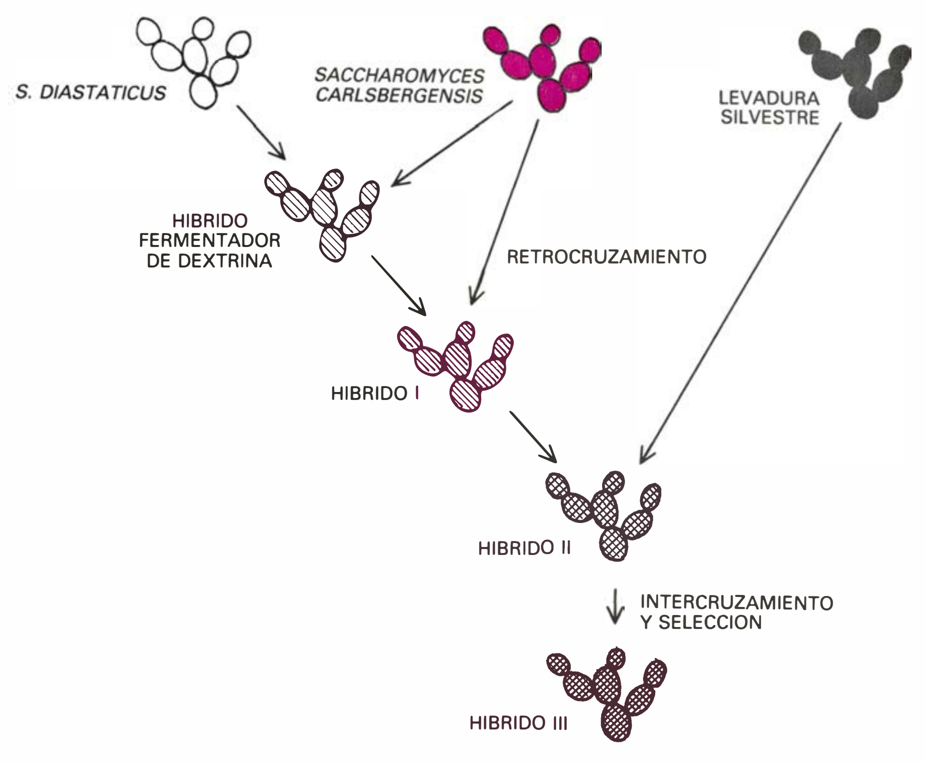
tadores industriales. En estos casos se requieren mutágenos potentes, para que podamos encontrar el mutante deseado examinando miles, y no ya millones, de individuos. Vamos a describir dos estrategias muy diferentes para la mejora de microorganismos industriales mediante reprogramación mutacional, valiéndonos de ejemplos que conducen a la producción de aminoácidos y antibióticos.

La lisina es un aminoácido esencial en la nutrición de los animales, incapazes de sintetizarlo. Carecen de ella muchas proteínas vegetales. Por cuya razón, y al objeto de que entre en los piensos de animales, se produce ese aminoácido en los fermentadores. Se basa el proceso en un conocimiento detallado de la vía que conduce a la biosíntesis bacteriana del aminoácido y del modo de su regulación genética. La habilidosa explotación de este conocimiento ha permitido seleccionar cepas mutantes de *Brevibacterium flavum* y de *Corynebacterium glutamicum* que convierten en lisina más de un tercio del azúcar del medio de cultivo, aportando concentraciones de más de 75 gramos de lisina por litro de medio. En esas bacterias, la lisina es un producto final de una vía ramificada que también lleva a la síntesis de los aminoácidos metionina y treonina. El principal control que asegura la síntesis de cantidades suficientes de estos aminoácidos para las necesidades de la bacteria, y evita su exceso, es una retroinhibición ("feedback") del primer enzima del sistema, la aspartato kinasa, mediante la acción conjunta de treonina y lisina. Es decir, una sobreabundancia de estos aminoácidos con respecto a los requerimientos del organismo tiende a interrumpir su síntesis, inhibiendo la actividad del enzima; y, a la inversa, una disminución en la cantidad de treonina o lisina aumenta su tasa de síntesis.

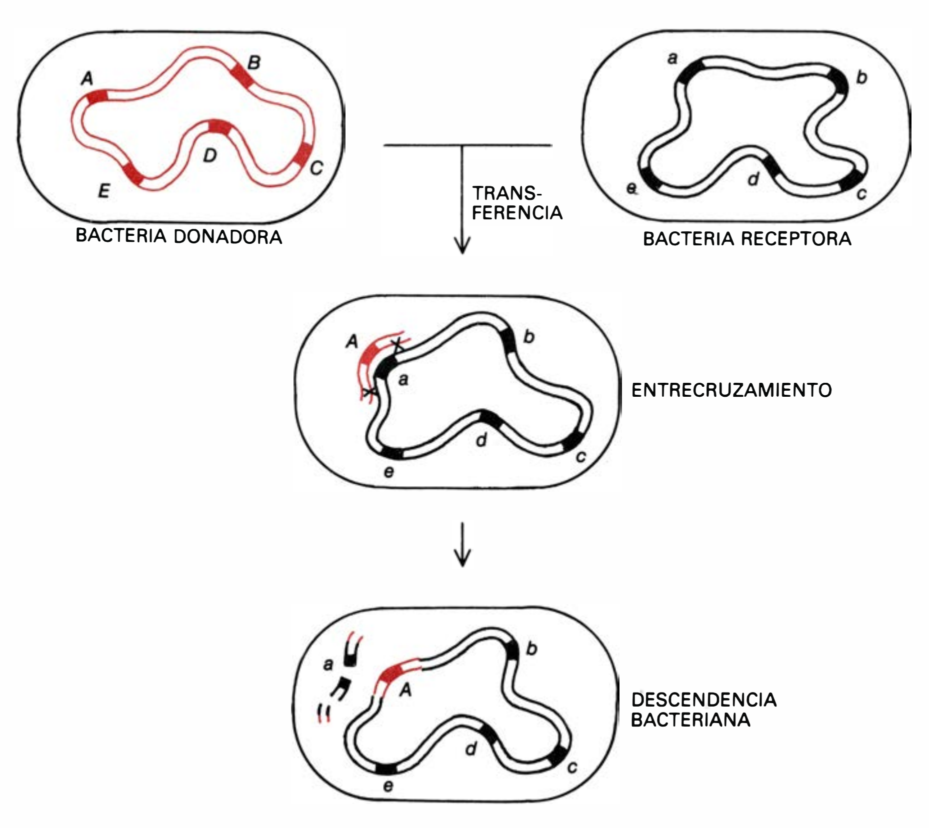
La superproducción de lisina, más allá de las propias necesidades de la bacteria, se ha conseguido tras aislamiento de dos tipos de mutantes. En uno de ellos, una mutación en el gen que codifica la homoserina deshidrogenasa anula la actividad del enzima y, en consecuencia, impide que la bacteria produzca treonina (uno de los productos inhibidores) y metionina. Cuando este mutante auxotrófico, o nutritivamente deficiente, se cultiva en un medio con la cantidad de treonina y metionina justa para mantener su crecimiento, pero sin suficiente treonina para colaborar con la lisina en la detención de la actividad de la aspartato kinasa, la



PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS de un microorganismo. Dependiente de un gran número de genes, la producción puede mejorarse mediante mutación y selección seguidas de cruzamiento, en que se recombinan los genes de dos organismos. Se trata una cepa silvestre con un mutágeno (*1*) y se ensayan las colonias hijas; algunas de ellas serán mejores productores. Se seleccionan las mejores cepas (*color*) y se mutagenizan de nuevo. El proceso se repite. Los dos mejores mutantes (*2*), que en este caso probablemente tendrán seis mutaciones distintas cada uno y, en consecuencia, diferirán en 12 genes, o fragmentos de genes, se cruzan. La recombinación puede dar lugar a 2^{12} (casi 5000) nuevos genotipos, o conjuntos de información genética, muchos de los cuales conducirán a rendimientos de antibióticos significativamente más elevados. Los mejores productores (*3*) pueden ser de nuevo objeto de recombinación o de mutación.



LEVADURA DE LA CERVEZA ***Saccharomyces carlsbergensis*****; convierte el azúcar en alcohol y dióxido de carbono pero fermenta solamente el 81 por ciento de los azúcares del licor de fermentación. Se desarrolla una cepa de levadura capaz de fermentar todo el azúcar, y, por tanto, de elaborar una cerveza muy "ligera", adecuada para diabéticos, cruzando varias especies de levadura de modo que se recombinen genes codificadores de enzimas que utilizan diferentes azúcares. *S. diastaticus* fermenta dextrinas. Cruzándola con *S. carlsbergensis*, origina un híbrido fermentador de dextrina que produce una cerveza de sabor desagradable. Volviendo a cruzar el híbrido varias veces con *S. carlsbergensis* se produce el híbrido I; éste convierte el 90 por ciento del azúcar y da lugar a cerveza con sabor agradable. El cruzamiento del híbrido con la levadura silvestre que fermenta isomaltosas produce el híbrido II, que utiliza el 100 por ciento del azúcar. De los intercruzamientos de cepas del híbrido II surgen cepas mejoradas (híbrido III).**



RECOMBINACION HOMOLOGA en bacterias. Ocurre cuando un fragmento del cromosoma de una célula donadora penetra en una receptora a través de alguno de los diversos procesos naturales o inducidos posibles. El ADN donador se aparea con una región homóloga, o correspondiente, del cromosoma receptor; se rompe e intercambia segmentos en el proceso denominado entrecruzamiento (*símbolo* ×), produciendo una nueva combinación de genes donadores y receptores. En el caso del cromosoma con cinco genes que se representan en el diagrama, se forma una de las 2^5, o 32, posibles combinaciones de genes. El gen donador *A* sustituye al gen *a* en el cromosoma; el gen *a*, excluido del cromosoma, se degrada.

vía de la lisina continúa funcionando a pleno rendimiento. Los mutantes auxotróficos se seleccionan ensayando millares de colonias tratadas con un mutágeno; los auxótrofos sólo se desarrollan si los factores especiales de crecimiento (en este caso, metionina y treonina) se hallan en el medio. Para aislar auxótrofos más eficazmente, se inocula un cultivo mutagenizado en un medio que carezca de los factores de crecimiento apropiados y que contenga penicilina, que sólo destruye bacterias en división; los auxótrofos no pueden reproducirse y, por consiguiente, sobreviven, en tanto que a las bacterias no mutadas las mata la penicilina.

Otro tipo distinto de mutante posee una forma alterada de la aspartato kinasa; ésta realiza bien su función enzimática, aunque no reacciona con la lisina y, consecuentemente, ha perdido su sensibilidad a la retroinhibición; y ocurre así que se acumulan altos niveles de lisina en el fermentador. Se llegó a la selección de estos mutantes merced a su carácter resistente a un compuesto denominado AEC, tan parecido a la lisina que imita su efecto regulador, inhibiendo la aspartato kinasa aunque no se esté sintetizando lisina. En presencia de AEC, las cepas silvestres mueren como resultado de la falta de lisina, en tanto que los mutantes proliferan y forman colonias. La obtención de lisina es un ejemplo de producción industrial dependiente de la selección racional de mutantes que carecen de los precisos controles reguladores de la producción de aminoácidos.

El caso de los antibióticos es muy diferente. Su síntesis sólo se realiza en determinadas etapas del ciclo vital de algunos mohos, Actinomicetes (bacterias filamentosas) y bacterias formadoras de esporas. Es poco lo que se sabe todavía de su regulación genética, aunque la cantidad de antibiótico producido depende ciertamente de numerosos factores. Los sistemas de control se muestran sensibles a varios aspectos del metabolismo celular (por ejemplo, disponibilidad de carbono, nitrógeno y fosfato), a la síntesis de bloques de la molécula que constituyen el antibiótico y a la resistencia del organismo a su propio antibiótico potencialmente tóxico. Como la producción de un antibiótico depende de cientos de genes, es imposible encontrar mutaciones individuales que puedan elevar la producción desde unos pocos miligramos por litro de la cepa silvestre hasta un nivel económico, como los 20 gramos o más por litro de penicilina o tetraciclina que se obtienen hoy de las cepas industriales altamente desarrolladas de *Penicillium chrysogenum* o *Streptomyces aureofaciens*, respectivamente.

Estas cepas, verdaderamente extraordinarias, se han alcanzado a través de numerosas y sucesivas rondas de mutación y selección. En cada ronda se trata con mutágenos un cultivo y se examinan miles de las colonias resultantes. Cuando aparece un mutante que manifiesta un aumento significativo de la producción, éste se utiliza como punto de partida para una nueva ronda de mutagénesis y selección. Con este procedimiento, se encauza la evolución del organismo en una dirección artificial hasta que se obtiene una cepa productora del antibiótico a escala económicamente rentable.

Semejante trabajo es lento y exige intensa dedicación. De resultados impredictibles, además, habida cuenta de que los niveles de antibiótico no sólo están fuertemente influidos por los genes del organismo productor, sino también por las condiciones de cultivo. En las primeras fases de un programa de mejora de la producción se encuentran mutantes beneficiosos simplemente ensayando la producción de las colonias que crecen en placas de cultivo, pero, con posterioridad, las cepas mejoradas deben evaluarse bajo condiciones que simulen (lo más fielmente posible) las que se encuentran en la producción comercial en fermentadores gigantes, con 75.000 litros o más de medio de cultivo. A pesar de estas dificultades, en nuestros días funcionan diversos programas de producción de antibióticos con un elevado rendimiento, basados en cultivos bacterianos que se han desarrollado a través de 20 o 30 selecciones.

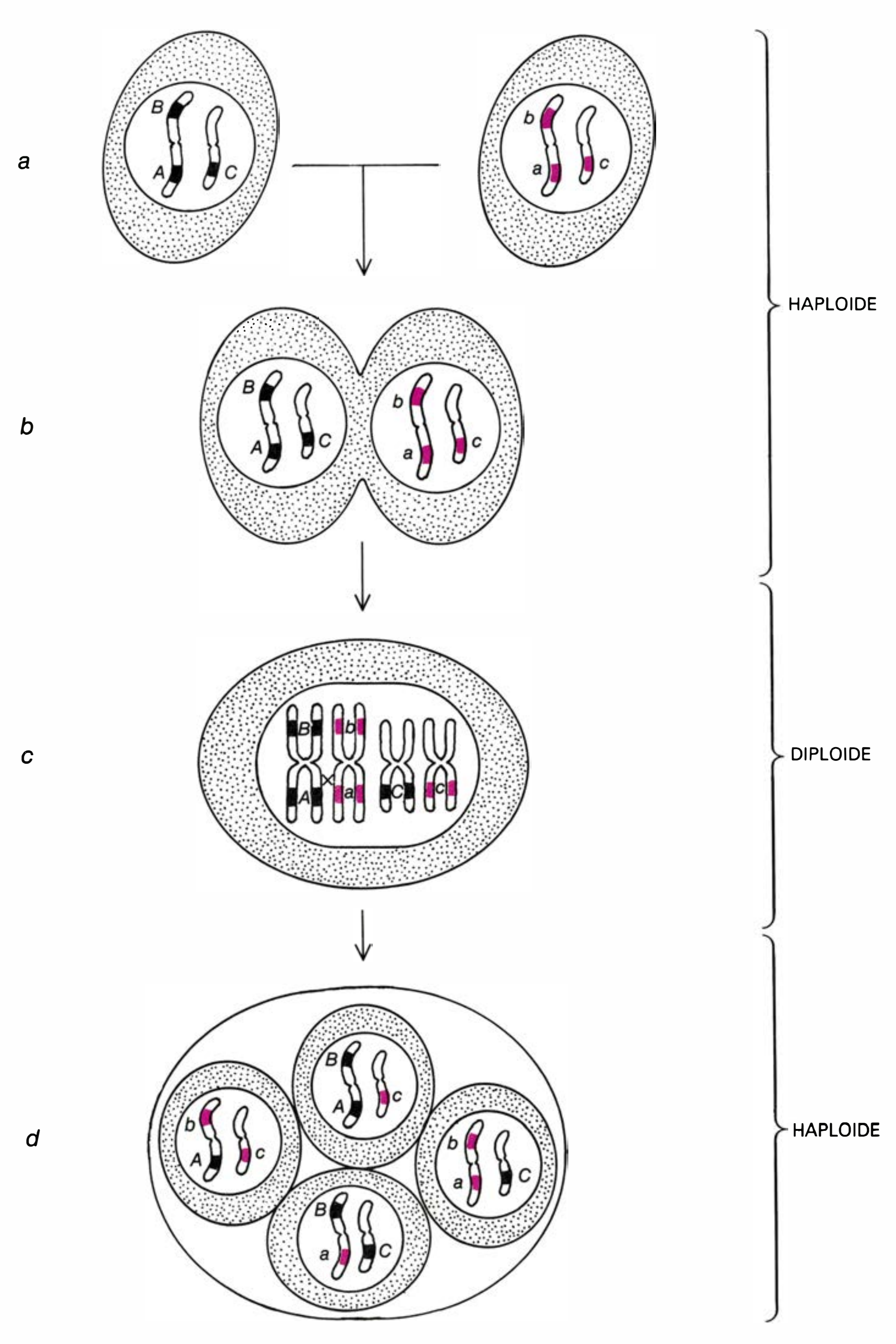
La mutación altera los genes de un microorganismo. La recombinación, la otra aproximación básica a la programación genética, reordena los genes, o partes de los genes, y agrupa en un mismo individuo la información genética de dos o más organismos. La recombinación tiene lugar a través de múltiples procesos naturales y de técnicas de laboratorio. La recombinación homóloga acontece cuando cromosomas bacterianos o eucarióticos que poseen secuencias de bases de ADN similares se reúnen por un proceso de apareamiento, e intercambian los segmentos correspon-

dientes mediante la rotura y ensamblaje del ADN. En el caso de los eucariotas, la reproducción sexual aporta otro proceso de reordenación en el que se mezclan las dotaciones cromosómicas de dos individuos.

La recombinación homóloga se muestra muy eficaz a la hora de producir nuevos genotipos, o conjuntos de información genética. Si dos individuos difieren en *n* genes o partes de éstos, la recombinación entre sus conjuntos de genes producirá 2^n genotipos. El apareamiento entre microorganismos de dos cepas cuyo ADN difiera solamente en una docena de pares de bases, dispersos entre millones de ellos, generará 2^{12}, es decir, casi 5000, genotipos nuevos. En la mayoría de los casos, las células paternas difieren en más que eso, y, al cruzarse, se alcanzan cifras astronómicas de nuevas combinaciones. Aunque es probable que casi todos los microorganismos sean capaces de intercambiar genes con cepas afines, resultan más bien raros los casos en los que se ha explotado la fuerza potencial de la recombinación genética natural para desarrollar cultivos industriales con características deseables, derivados de más de una cepa. Las levaduras industriales aportan algunos ejemplos.

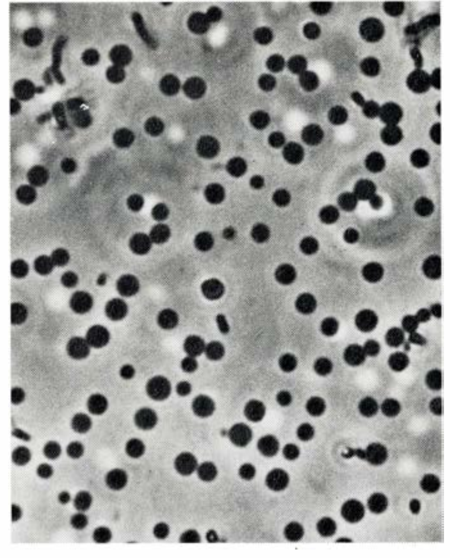
El ciclo de vida más sencillo de las levaduras es aquél en el que la cepa es haploide, no diploide. Es decir, posee sólo un juego de cromosomas, portador de un solo conjunto completo de genes, en vez de dos juegos de cromosomas (como es el caso de la mayoría de animales y plantas), con dos copias de cada gen. Una célula típica de levadura podrá someterse a reproducción sexual, y por tanto, a recombinación genética sólo cuando se encuentre una cepa relacionada del tipo opuesto de apareamiento, o "sexo". Las dos células se fusionan dando una célula temporalmente diploide, en la que las esporas sexuales haploides que se forman poseen diferentes combinaciones de los genes de las células paternas. Las levaduras industriales pueden apartarse de este sencillo modelo si disponen de varios conjuntos de cromosomas o si se aparean sólo de forma intermitente. La hibridación de diferentes cepas –a menudo de diferentes especies– ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de las levaduras industriales, especialmente bien adaptadas a la rápida producción de pan por métodos de fabricación modernos, en el incremento del contenido en alcohol de licores para destilación y en la preparación de cervezas especiales de las que se han eliminado casi todos los carbohidratos solubles [*véase el artículo siguiente* "Producción microbiológica de alimentos y bebidas", por Anthony H. Rose].

De ordinario, sólo los miembros de especies estrechamente relacionadas se aparean con éxito. No obstante, las barreras naturales de la recombinación entre organismos diferentes pueden romperse a menudo mediante la preparación de protoplastos, células bacterianas o fúngicas cuyas duras paredes externas se han eliminado, poniendo al descubierto la fina membrana celular. Puesto que las membranas celulares



RECOMBINACION EN LOS EUCARIOTAS. Implica el entrecruzamiento entre partes del cromosoma y la reordenación de éstos. Una levadura típica es haploide la mayor parte de su ciclo vital. Porta una dotación única de 15 o más cromosomas. Aquí se muestran tan sólo dos. Un par de células de distinto tipo de apareamiento (*a*) pueden fusionarse (*b*). Después, se fusionan los núcleos formando un núcleo diploide con dos dotaciones completas de cromosomas. Durante la meiosis (una fase de la reproducción sexual) los cromosomas están compuestos por dos cromátidas (*c*). Los cromosomas homólogos se aparean e intercambian partes de sus cromátidas mediante entrecruzamiento. Después, se forman cuatro esporas sexuales haploides (*d*). Cada espora puede tener una nueva combinación de los genes que diferían entre las progenitoras (*negro y color*): los genes situados en el mismo cromosoma (*A, a; B, b*) se recombinan por entrecruzamiento y los de cromosomas diferentes se barajan como miembros de pares cromosómicos reordenados.

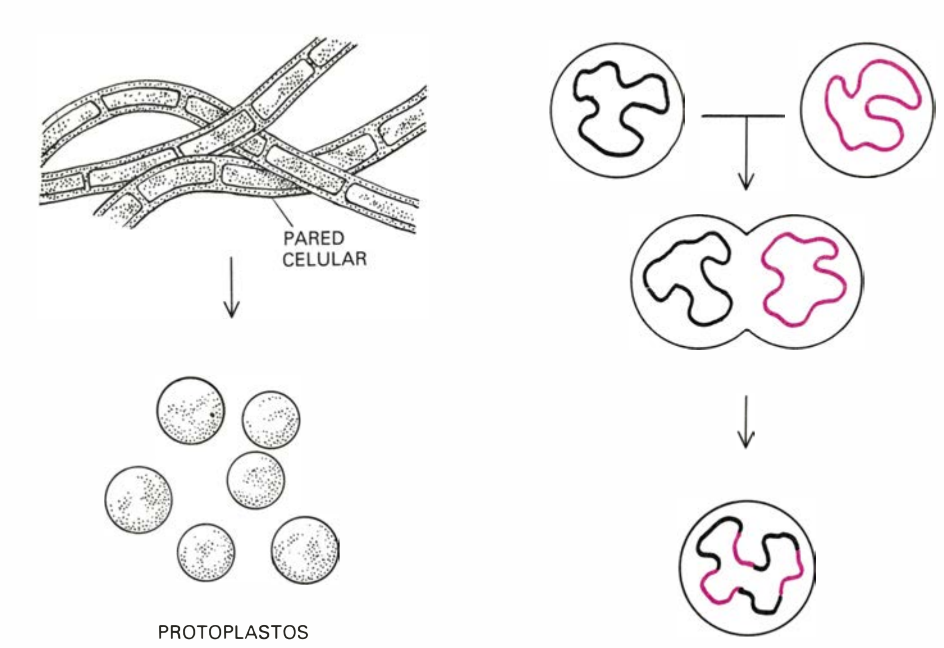




UNOS PROTOPLASTOS ESFERICOS y las células bacterianas de las que proceden aparecen aumentados 1500 veces en esta micrografía, realizada por Keith Chater y el autor. Una resistente pared celular rodea las células filamentosas de *Streptomyces coelicolor* (*izquierda*). Se digiere la pared con el enzima lisozima; las células quedan así rodeadas únicamente por su delgada membrana celular. La esfericidad de los protoplastos (*derecha*) se sigue del hecho de hallarse en una disolución concentrada de azúcar, cuya presión osmótica equilibra la interior de las células. Puede inducirse ahora la fusión de los protoplastos.

poseen aproximadamente la misma composición en la mayoría de las especies, puede inducirse la fusión de protoplastos de especies distintas; se forma así una célula híbrida, en la que los genes quedan expuestos a la recombinación.

La fusión de protoplastos constituye también una técnica eficaz para aumentar la frecuencia de recombinación intraespecífica en organismos en los que el apareamiento natural es raro, como sucede en muchas especies del actinomicete *Streptomyces*. Los protoplastos se preparan por digestión de la pared celular bacteriana con el enzima lisozima. La operación se lleva a cabo en una disolución de azúcar cuya presión osmótica equilibra la presión interior de las células. De no hacerse así, estallaría la delicada membrana celular. La fusión de los protoplastos pertenecientes a dos cepas distintas se facilita por un tratamiento con polietilenglicol; en la célula híbrida resultante puede recombinarse el ADN paterno. Se induce luego la regeneración de la pared celular de los protoplastos híbridos y se obtiene un cultivo normal. La fusión es tan eficiente que las células de dos cepas de *Streptomyces* pueden hibridarse y dar una población en la que al menos una de cada cinco células posea una nueva combinación de genes. De esta forma, quizá puedan combinarse, en un solo paso, grupos de genes mutados que aumenten la producción de antibióticos, acumulados laboriosamente en líneas separadas por rondas sucesivas de mutación y selección.



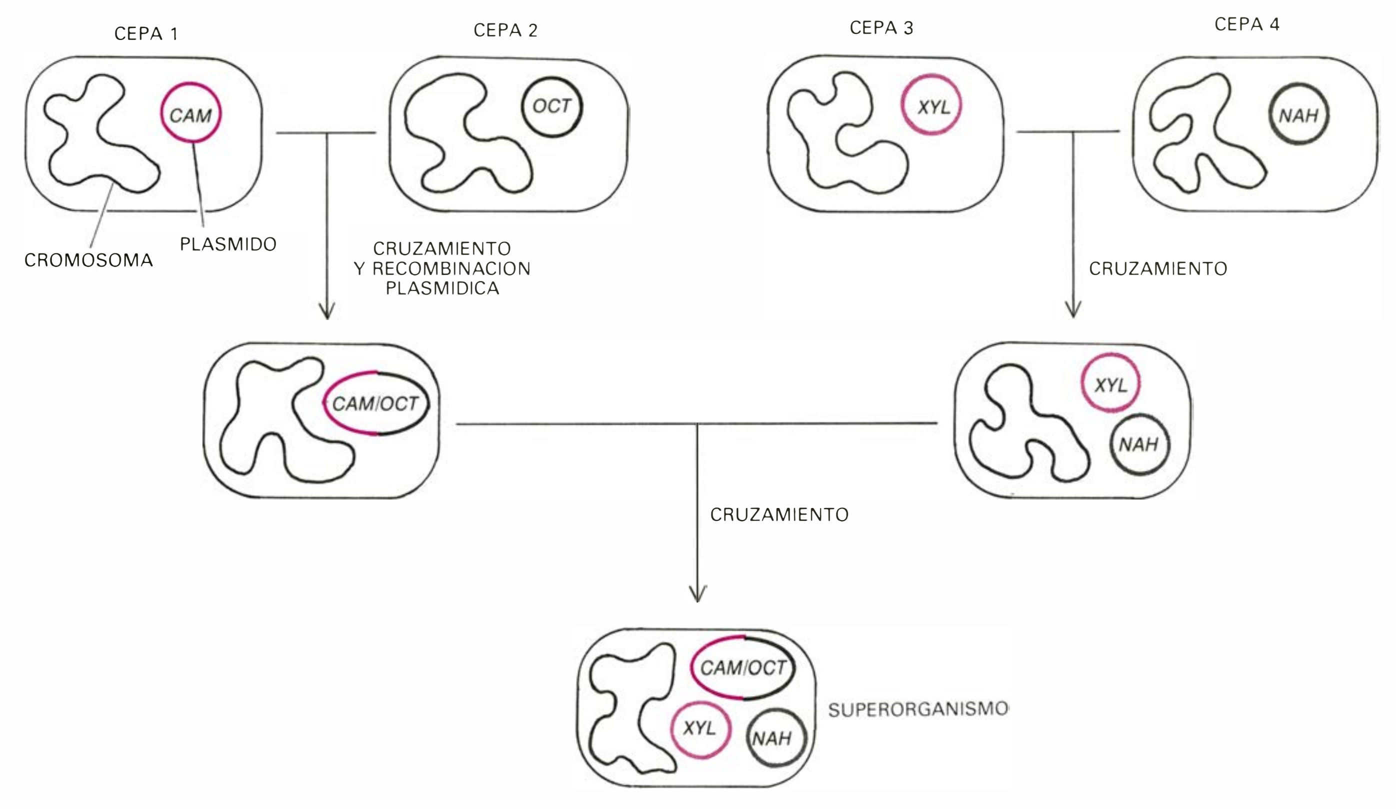
A TRAVES DE LA FUSION DE PROTOPLASTOS se recombinan los genes de dos especies que no se aparean. La fusión permite también mejorar la recombinación entre cepas de un organismo como *Streptomyces*, que raramente se aparea. Los protoplastos se forman a partir de células de *Streptomyces* (*izquierda*). Los protoplastos de dos cepas se tratan con polietilenglicol (*derecha*), se fusionan y forman una nueva célula híbrida con dos cromosomas, cuyos segmentos se recombinan y producen un nuevo genotipo.

En tanto que la recombinación homóloga permite un intercambio de segmentos de ADN, otras formas de recombinación añaden nuevo ADN al que ya posee el microorganismo. Uno de estos procesos es el de la transferencia de plásmidos. Estos son pequeñas moléculas circulares de ADN extracromosómico, presentes en las bacterias y en algunas levaduras, capaces de replicación autónoma en la célula y heredables por las células hijas. Los plásmidos llevan a menudo genes que confieren a la bacteria propiedades especializadas. Pueden transferirse de una cepa bacteriana a otra no relacionada y, en ocasiones, a diferentes especies, introduciendo así propiedades genéticas totalmente nuevas. Algunos plásmidos codifican estructuras que inducen el apareamiento entre bacterias; determinan, pues, su propia transferencia de una a otra célula. Los plásmidos también pueden transferirse de una bacteria a otra mediante un bacteriófago, o virus bacteriano. Asimismo, el ADN plasmídico desnudo, liberado de la célula huésped por la rotura (natural o inducida) de ésta, puede entrar en una nueva célula; este proceso, que se ha dado en llamar transformación, puede facilitarse grandemente por medio de diversas técnicas de laboratorio.

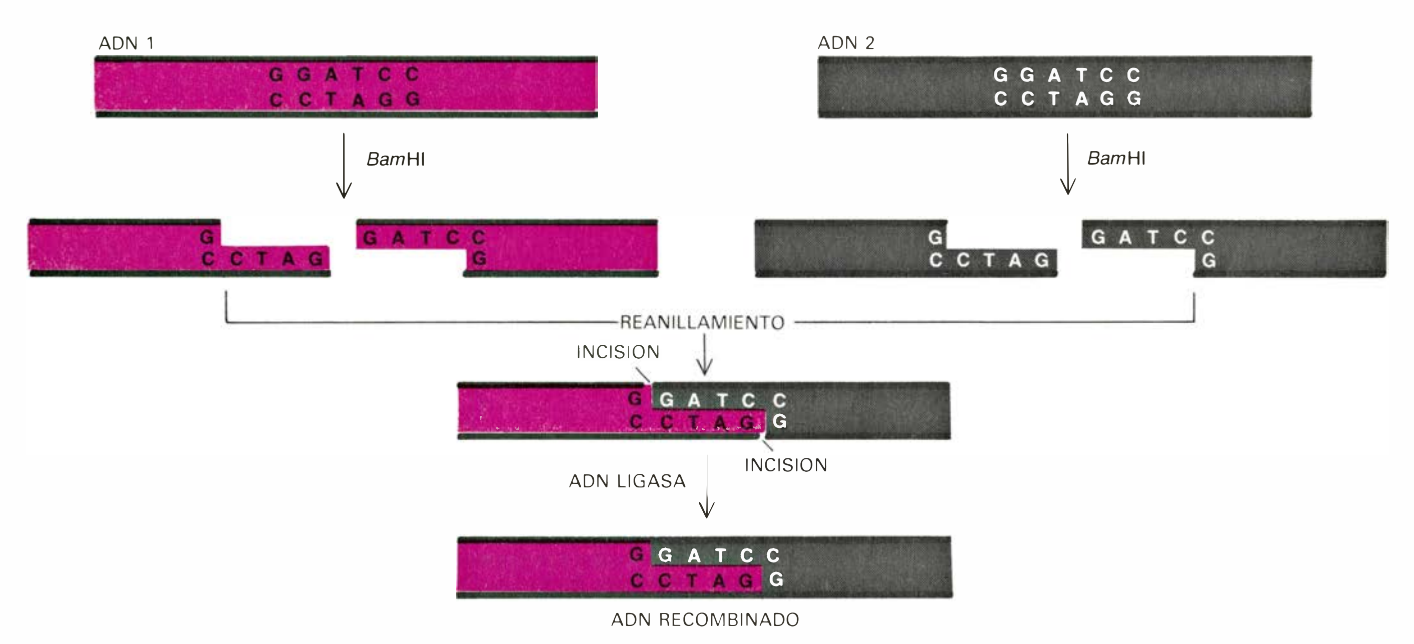
Un ejemplo de la utilización de plásmidos que existen en la naturaleza es la construcción de una bacteria capaz de metabolizar, y por tanto degradar, la mayoría de los principales hidrocarburos del petróleo. Numerosas cepas de *Pseudomonas putida* albergan un plásmido codificador de enzimas que digiere una sola clase de hidrocarburos. Cuatro de tales plásmidos son el *OCT* (que digiere octano, hexano y decano), el *XYL* (digiere xileno y tolueno), el *CAM* (alcanfor) y el *NAH* (naftaleno).

De estos plásmidos, dos, *CAM* y

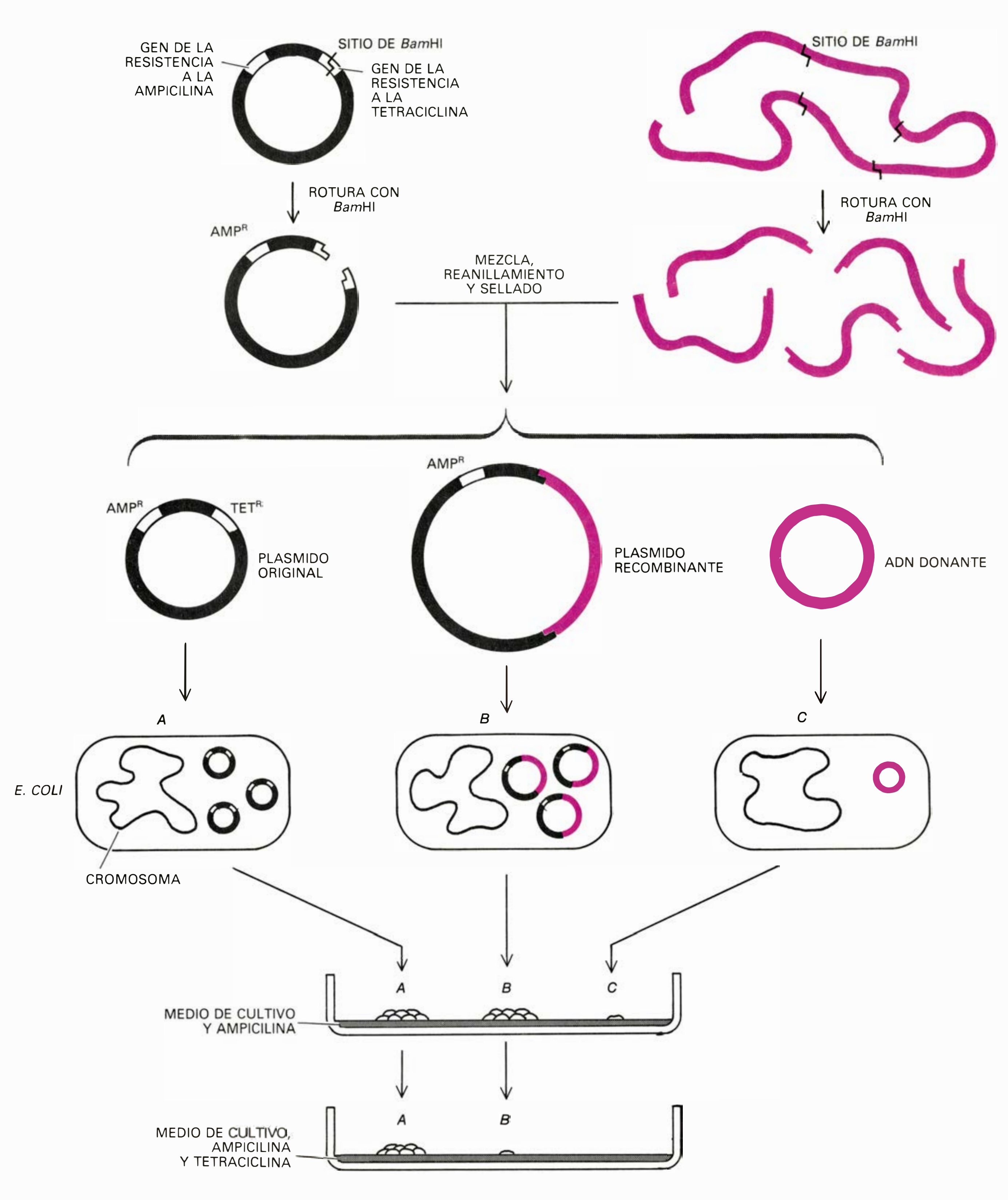
NAH, llevan a cabo su propia transferencia determinando el apareamiento entre bacterias; los otros no pueden hacerlo, pero sí se transfieren cuando se suministran otros plásmidos que determinen el apareamiento. Mediante cruzamientos sucesivos se ha creado un "superorganismo" que lleva los plásmidos *XYL* y *NAH*, así como un plásmido híbrido obtenido recombinando partes de *CAM* y *OCT* ("incompatibles" entre sí y que no pueden coexistir como plásmidos separados en la misma bacteria). La bacteria multiplasmídica crece rápidamente a base de una dieta de petróleo crudo, ya que metaboliza muchos más hidrocarburos que cualquier otra de las cepas de un solo plásmido. Queda por ver si el superorganismo da resultado en la eliminación de fugas o contaminación de petróleo; pero, al



"SUPERORGANISMO" capaz de metabolizar los principales hidrocarburos del petróleo. Su creación constituye un éxito de la manipulación de plásmidos. La capacidad que muestran cuatro cepas diferentes de *Pseudomonas putida* de metabolizar las familias de hidrocarburos alcanfor (*CAM*), octano (*OCT*), xileno (*XYL*) o naftaleno (*NAH*), depende de enzimas cuyos genes no se hallan en los cromosomas, sino en distintos plásmidos. Se ha procedido a la construcción de una cepa capaz de degradar las cuatro familias. Dado que los plásmidos *CAM* y *OCT* no pueden coexistir en una célula, hay que superar otra etapa: la formación de un plásmido híbrido en el que estén recombinadas las partes de los plásmidos que llevan los genes codificadores de los enzimas.



LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION constituyen las herramientas básicas en la tecnología del ADN recombinante. Son enzimas bacterianos que reconocen determinadas secuencias palindrómicas (con simetría de rotación) en la cadena del ADN, cortándola en lugares específicos de esas secuencias. El enzima *Bam*HI (designado así porque procede de *Bacillus amyloliquefaciens*) y muchas otras endonucleasas cortan el ADN de tal forma que dejan segmentos unicatenarios, denominados "extremos adherentes", cuyas bases son complementarias. Dos ADN de diferente origen (*color y gris*), ambos cortados por *Bam*HI, pueden volver a "anillarse" por el apareamiento de las bases. Las "incisiones" de las cadenas del ADN reanillado las sella el enzima ADN ligasa.



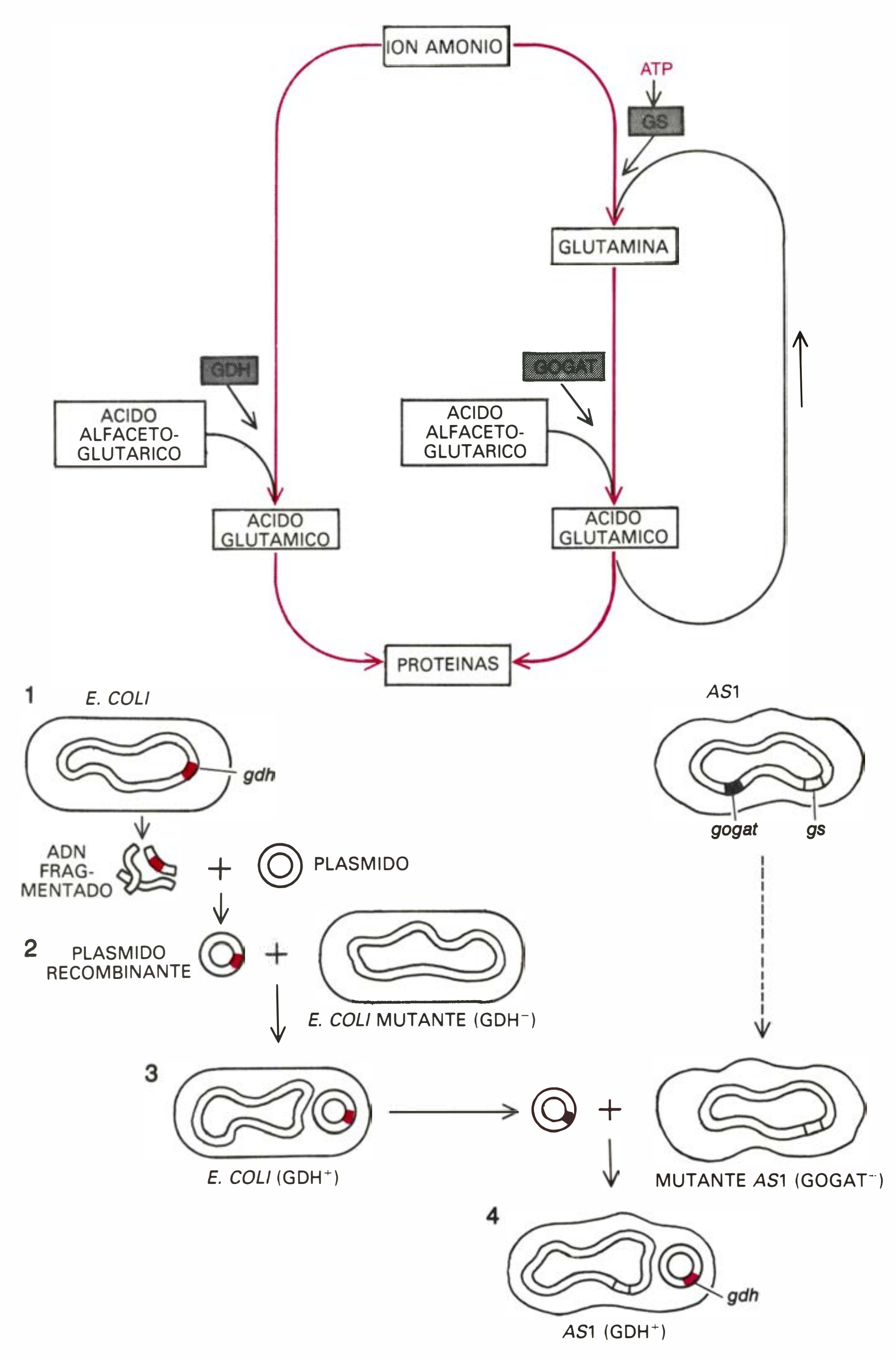
INTRODUCCION DE UN GEN EXTRAÑO en la bacteria *Escherichia coli* por un plásmido vector, produciéndose así un clon de la bacteria portadora del gen. Aquí, el plásmido lleva genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y tetraciclina. Un plásmido tratado con *Bam*HI se corta en un punto situado dentro del gen de resistencia a la tetraciclina; se producen extremos adherentes. El ADN de un organismo donador se corta también con *Bam*HI en una serie de fragmentos que poseen los mismos extremos coherentes. El vector cortado y el ADN donador se mezclan, reanillan y traban. Se forma una mezcla de moléculas: plásmidos recircularizados (*izquierda*), plásmidos recombinantes que incorporan un segmento del ADN donador (*centro*) y ADN donador circularizado (*derecha*). Las células de *E. coli* se transforman con la mezcla e incorporan varias moléculas. Si la molécula transformante es un plásmido, se replica y lo heredan las bacterias hijas, confiriéndoles resistencia a la ampicilina. Pueden identificarse estas células (*A*, *B*) porque una muestra de ellas crecerá sobre un medio que contenga ampicilina, en tanto que las células no transformadas, o las que únicamente lo sean para el ADN donador (*C*), mueren. Se recoge con un disco de terciopelo una "réplica" de las colonias resistentes a la ampicilina y se transfiere a un medio que contiene tetraciclina y ampicilina. Llegadas a esta fase, cualquier célula que albergue plásmidos recombinantes (*B*) morirá, pues se ha destruido el gen de la resistencia a la tetraciclina en los plásmidos. Se ensaya entonces el cultivo que origina la colonia *B* para identificar los clones portadores de determinados genes donadores.

menos, ya ha tenido una trascedencia legal: su patente, la primera concedida a un organismo manipulado genéticamente, ha sido confirmada por el Tribunal Supremo de los Estados Unidos.

Existen otros plásmidos naturales portadores de genes que codifican propiedades con potencial industrial. En el laboratorio del autor, en el Instituto John Innes, Gran Bretaña, se ha hallado que la síntesis de algunos de los antibióticos producidos por varias especies de *Streptomyces* no está controlada por el ADN cromosómico, sino por un plásmido. La diversidad de estos antibióticos explica su eficacia en una amplia gama de aplicaciones, no sólo en medicina humana y veterinaria, sino también como suplemento de alimentos animales y en el control de algunas enfermedades vegetales. La transferencia, a un solo huésped de *Streptomyces*, de varios plásmidos que codifican diferentes antibióticos posibilitaría que sus enzimas cooperaran en la síntesis de nuevos antibióticos con nuevas propiedades.

La capacidad de aislar ADN plasmídico de un cultivo e inducir su incorporación en otro constituye el fundamento de la mayoría de las manipulaciones del ADN recombinante. Uno o varios genes tomados de un organismo no relacionado, o un gen sintetizado artificialmente, pueden empalmarse en un plásmido; y, luego, introducirse éste en un nuevo huésped microbiano. El plásmido sirve así de vector para genes que no tienen equivalente en el organismo receptor y que, por tanto, no podrían heredarse de forma estable mediante recombinación homóloga. Estos genes pueden transmitirse ahora indefinidamente a través de generaciones sucesivas, conforme el plásmido va replicándose. También el ADN de algunos virus cumple funciones de vector, siempre que puedan infectar un microorganismo y se hereden sin acabar con el huésped. Muchos virus bacterianos (bacteriófagos "atenuados") pueden hacerlo. Hay virus, asimismo, que infectan vegetales y animales, lo que abre el camino de la industria a la ingeniería genética de células vegetales y animales.

Las técnicas de ADN recombinante son aplicables de múltiples formas en la industria. La más conocida es la producción por un microorganismo de una proteína que éste no sintetiza normalmente, por ejemplo, un enzima o una hormona. En cuyo caso, se trata de transferir un determinado gen que codifique el producto deseado a un microorganismo huésped y favorecer su crecimiento en masa para obtener el producto. (Hasta ahora la bacteria *Escherichia coli*, verdadero caballo de batalla de la biología molecular, ha servido casi exclusivamente como huésped, ya que se dispone de plásmidos vectores efectivos, cuyo ADN ha sido cartografiado con detalle. Quizá convenga, en el futuro, escoger otros huéspedes, mejor adaptados al crecimiento en grandes fermentadores industriales.) Otro objetivo de la ingeniería plasmídica, bastante diferente, es el de la mejora genética de una cepa industrial ya existente. En vez de introducir una



LA INGENIERIA GENETICA sustituye una vía del nitrógeno consumidora de energía (*arriba, a la derecha*) por otra similar, pero conservadora de energía (*arriba, a la izquierda*), en la cepa *AS*1 de *Methylophilus methylotrophus*. Ambas vías toman el nitrógeno del ion amonio y lo convierten en aminoácidos para formar proteínas, pero el paso al ácido glutámico, catalizado por el enzima GDH (en *E. coli* y en algunas otras especies) no requiere energía liberada por el ATP, en tanto que uno de los dos pasos catalizados por los enzimas GS y GOGAT (como en la cepa *AS*1) sí lo precisa. Por medio de técnicas de ADN recombinante se aisla de *E. coli* el gen codificador de la GDH y se empalma en un plásmido (*1*). El mutante de *E. coli* carente de GDH se transforma con el plásmido recombinante (*2*). Las células transformadas pueden reconocerse por su capacidad para obtener nitrógeno a partir del ion amonio. Los plásmidos recombinantes vuelven a aislarse y se introducen en células *AS*1 mutantes carentes del gen para la GOGAT (*3*). Las células *AS*1 transformadas (*4*) sintetizan la GDH y se multiplican con mayor eficiencia.

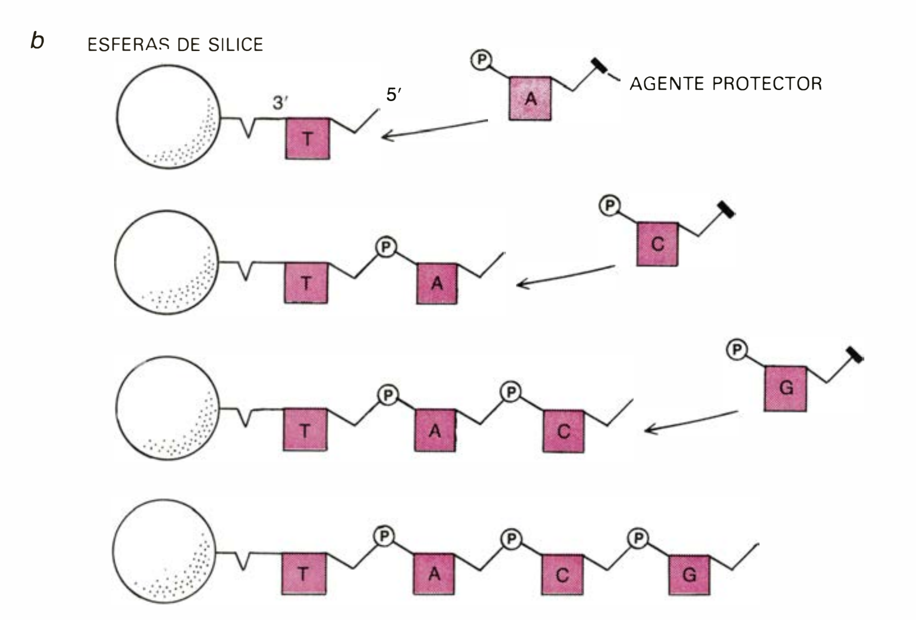
nueva capacidad genética, puede mejorarse el rendimiento de una cepa que se viene aprovechando, si bien modificando su información genética. Finalmente, las técnicas de recombinación genética habrán de permitir refinar los procedimientos tradicionales a través de la mutación de lugares específicos en genes determinados, venciendo así la naturaleza casual de la mutagénesis normal.

Los métodos básicos de la tecnología del ADN recombinante pueden describirse en términos de su aplicación a la producción de una proteína deseada. El trabajo realizado en los últimos años en laboratorios de todo el mundo ha facilitado notablemente la ruptura de las moléculas gigantes de ADN, como las de los cromosomas, en una serie de fragmentos cortos. Esa operación se realiza con la ayuda de unos enzimas especiales, conocidos como endonucleasas de restricción, que cortan el ADN en secuencias de bases específicas. Algunos enzimas de éstos generan fragmentos con "extremos adherentes". Los fragmentos portadores del gen a transferir se insertan en los vectores plasmídicos (o bacteriofágicos) cortados con el mismo enzima y poseen, por tanto, extremos apareables. Los plásmidos recombinantes que resultan se introducen en *E. coli* por transformación. Pueden seleccionarse los clones de bacterias (colonias de bacterias descendientes de una sola célula paterna) que albergan el plásmido, ya que crecen en presencia de un antibiótico, la resistencia al cual la confiere un gen del plásmido. La presencia en el plásmido recombinante del fragmento extraño deseado puede reconocerse por medio de pruebas que detecten el producto proteínico que se busca. Las bacterias que albergan el plásmido se multiplican después en clones de millones de células; cada una de ellas portará una copia del gen extraño.

En principio es posible, aunque en la práctica laborioso, clonar cualquier gen que interese, pongamos por caso el gen humano natural que codifica la insulina. ¿Cómo? Clonando "en perdigonada" el ADN humano. Es decir, se inserta una mezcla aleatoria de fragmentos del tamaño de un gen del ADN humano entero en plásmidos y, después, en *E. coli*; posteriormente, se buscan, entre un millón o más de clones, las bacterias transformadas que tienen el gen deseado. Estas células no sirven como fábricas de insulina bacteriana, ya que las bacterias no pueden expresar genes eucarióticos que contienen intrones. Es preciso construir un gen artificial no dividido.

Un procedimiento consiste en aislar ARN mensajero procedente de las células pancreáticas humanas que fabrican la insulina. Las células en cuestión abundan en ARN mensajero de insulina, del que ya se han eliminado los intrones. Con el enzima denominado transcriptasa inversa se fabrica un "ADN copia" artificial, que lleva la información genética ininterrumpida para la insulina; por último, se clona este

a
CONTROL POR MICROPROCESADOR
4 3 2 1 C T G A
DEPOSITOS DE REACTIVOS Y DISOLVENTES
DEPOSITOS DE NUCLEOTIDOS
BOMBA
AL COLECTOR
DESECHADO
COLUMNA DE SINTESIS



"MAQUINAS DE GENES", de las que se dispone en la actualidad de varios tipos. Esos "dispositivos" sintetizan cortas secuencias específicas de ADN unicatenario, de manera automática y muy rápida, bajo el control de un microprocesador. Se presenta un esquema (*a*) de la versión construida por Bio Logicals, una empresa canadiense. La secuencia de bases deseada se marca con un teclado. El microprocesador abre sucesivamente las válvulas correspondientes para que los nucleótidos, reactivos y disolventes necesarios en cada etapa se bombeen hasta la columna de síntesis. La columna contiene, bien compactadas, diminutas esferas de sílice (con una consistencia parecida a la de la arena fina); cada esfera sirve de soporte para que se vayan ensamblando las moléculas de ADN. Si se quiere obtener una secuencia determinada (*b*), se usa una columna en la que a cada esfera se ha fijado inicialmente el nucleósido (base más azúcar) que debe constituir el extremo 3' de la secuencia (en este caso, *T*), dejando libre la parte 5' del nucleósido. El microprocesador bombea en la columna miles de copias del siguiente nucleótido (*A*), con su parte 5' protegida de las reacciones no deseadas; las *A* se unen a las *T*. Se elimina el agente protector, dejando el lado 5' libre para aceptar el siguiente nucleótido (*C*). De esta manera se han sintetizado cadenas de unos 40 nucleótidos, a la velocidad de aproximadamente un nucleótido cada 30 minutos. Terminadas las cadenas, se separan de las esferas y se eluyen de la columna hacia el colector. Ilustración de Bunji Tagawa.

ADN copia. Otro procedimiento sería (conociendo la secuencia de aminoácidos de una proteína, como es el caso de la insulina humana) sintetizar un gen artificial, uniendo los nucleótidos del ADN de acuerdo con la clave genética. Esto se ha llevado a cabo con algunas proteínas cortas; la fabricación de "máquinas de genes" que sinteticen segmentos específicos de ADN haría más factible el método.

Sin embargo, ni el gen ADN copia ni el gen sintetizado artificialmente llevan el promotor adecuado ni otras señales de control, necesarios para la expresión en las bacterias. Es preciso, por tanto, empalmar el gen artificial al ADN vector en un punto donde las señales de control bacterianas en el vector conduzcan a la expresión del gen artificial. La tarea no acaba aquí. A menudo las bacterias digieren las proteínas extrañas, de manera que hay que modificar la célula huésped para que no destruya su nuevo producto; debe seleccionarse un huésped mutante que haya perdido los enzimas de digestión proteínica. También ha de seleccionarse o modificarse el huésped para que se desarrolle bien, a pesar de tener que acumular o segregar grandes cantidades de una proteína que no necesita. El estímulo comercial para el desarrollo de fermentaciones productoras de proteínas terapéuticas, como la insulina humana, la hormona del crecimiento o el agente antivírico interferón, es tan grande, que cabe presumir una pronta superación de los diversos obstáculos hoy existentes.

¿Por qué no pensar en programar microorganismos para fabricar proteínas que no se presentan de manera natural en ningún organismo? El reciente éxito obtenido en la clonación de genes de ADN copia del interferón humano ha revelado la existencia de una cantidad sorprendentemente grande de interferones, que no sólo difieren en su secuencia de aminoácidos, sino también en sus propiedades. Se podrían fabricar miembros totalmente nuevos de la familia del interferón, por medio de un equivalente artificial de la recombinación homóloga, empalmando partes de dos genes (aislados de dos clones de *E. coli*) que codificasen diferentes interferones naturales. El gen híbrido se volvería a introducir en el huésped bacteriano. Este procedimiento proporcionaría muchas moléculas nuevas que se ensayarían para probar su valor terapéutico. Después, cuando se conocieran mejor las relaciones entre la arquitectura de las proteínas y sus propiedades biológicas, podrían incluso diseñarse proteínas enteramente nuevas y manufacturarlas sintetizando y clonando genes artificiales.

La mejora genética de una cepa ya existente resulta apropiada en el caso de substancias, antibióticos y alcaloides entre ellas, que no están directamente codificadas por genes, sino que se sintetizan a través de vías controladas por varios productos génicos. Más que intentar la difícil tarea de trasplantar el conjunto entero de genes para tales productos en un huésped absolutamente extraño, no habituado a expresarlos, podría modificarse la información genética de una cepa industrial existente. Se podría incrementar, por ejemplo, el flujo a través de un cuello de botella metabólico añadiendo copias duplicadas de un gen, dando al microorganismo un nuevo enzima que pudiera modificar un metabolismo natural y fabricar así el producto que interesara. Ya se están desarrollando sistemas de clonación con tales objetivos.

Un ejemplo de la reprogramación por ingeniería genética de un buen microorganismo industrial, para hacerlo aún mejor, es el de la cepa *AS*1 de la bacteria *Methylophilus methylotrophus*. Las células se multiplican en fermentadores gigantes y después se recogen y se secan, obteniéndose un suplemento de la alimentación animal rico en proteínas. La cepa *AS*1 utiliza el metanol como fuente de carbono y el ion amonio como fuente de nitrógeno. La vía mediante la cual convierte el ion amonio en proteínas, a través del ácido glutámico, empieza con dos reacciones catalizadas por los enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT). Esta vía desperdicia bastante energía, ya que el paso catalizado por la GS consume el transductor de energía celular adenosín trifosfato (ATP). En algunas otras bacterias, incluida *E. coli*, existe una vía que utiliza un enzima diferente, la glutamato deshidrogenasa (GDH), para fabricar el ácido glutámico, y requiere menos energía.

Se ha desarrollado una cepa de *AS*1 que ahorra energía. En primer lugar se aisló un mutante auxotrófico de *AS*1 carente de GOGAT e incapaz, por tanto, de convertir el ion amonio en proteínas. Después se clonó el gen de *E. coli* para la GDH, introduciendo fragmentos del cromosoma de *E. coli*, unidos a un vector plasmídico, en una cepa mutante de *E. coli* carente de GDH. El clon deseado podía reconocerse porque, a diferencia de la cepa mutante de *E. coli*, era capaz de utilizar el ion amonio. El plásmido vector se había escogido en base a su capacidad para transferirse (mediante conjugación o transformación) a bacterias de muchas especies diferentes, *AS*1 incluida. De esta forma, en el paso final, se pudo transferir el gen GDH clonado al auxótrofo *AS*1 carente de GOGAT. La cepa resultante, equipada con GDH en lugar de GOGAT, se desarrollaba con menor gasto de energía. Aunque se trate de un modesto incremento en el rendimiento energético, el resultado es valioso cuando se están fabricando miles de toneladas de un producto.

Una aplicación especialmente interesante de la tecnología del ADN recombinante es la mutación dirigida. Lo azaroso de la mutagénesis espontánea, e incluso inducida, ha hecho difícil encontrar organismos mutantes con alteraciones en lugares específicos de su ADN. Ello no resulta crítico cuando se necesita desarrollar un mutante auxotrófico carente de un enzima particular, ya que el blanco de la mutagénesis es bastante grande: un cambio en uno cualquiera de los cientos de pares de bases de un gen puede inactivarlo. Es mucho más difícil, no obstante, alterar una parte específica de un gen de forma calculada para mejorar su actuación, por ejemplo, modificar un par de bases particular en una región promotora para aumentar la velocidad de transcripción. En la actualidad se puede ya aislar un gen a partir de un clon, alterar su secuencia de ADN por tratamientos químicos específicos fuera de la célula y volverlo luego a introducir en el huésped; puede confiarse a la recombinación homóloga el cambio del gen normal por el nuevo.

No cabe duda de que la genética microbiana industrial ha adquirido ya la mayoría de edad. Disponemos de múltiples técnicas para la programación genética, en las que ni siquiera podía soñarse hace tan sólo unos años. Entre ellas, la mutagénesis dirigida, que contribuye a vencer el azar intrínseco a los procedimientos basados en el aislamiento de mutantes, la fusión de protoplastos, que aumenta el poder de la recombinación natural, y toda una batería de manipulaciones del ADN recombinante para trasplantar genes naturales e incluso para la fabricación de otros nuevos. La aplicación juiciosa de estas técnicas, solas o combinadas, potenciará enormemente la capacidad humana para entender la asombrosa versatilidad bioquímica de los microorganismos, para incrementarla y encauzarla sabiamente.

Ciencia y sociedad

¿A qué llamamos ingeniería genética?

Se está afianzando la opinión de que, en los próximos lustros, la manipulación genética revolucionará el sector de los productos farmacéuticos (antibióticos, enzimas, vitaminas, hormonas o vacunas) y el alimentario. Sin olvidar la "creación" de poblaciones de bacterias programadas para la captación de energía del sol o para la solubilización y procesamiento de minerales. ¿Cómo se ha llegado hasta las puertas de ese cambio tecnológico tan drástico? ¿Por qué los expertos han decidido que las inversiones encauzadas hacia la preparación de ciertas substancias por manipulación de genes resultarán las más rentables en las próximas décadas?

La razón hay que buscarla en el prodigioso desarrollo de la biología molecular, que ha cristalizado en una metodología denominada ingeniería genética (y también manipulación genética); se ocupa ésta del aislamiento, multiplicación (amplificación) y modificación de genes para su estudio y aprovechamiento. El proceso de aislamiento y multiplicación implica unir en el tubo de ensayo material genético procedente, muy frecuentemente, de organismos distintos, para formar combinaciones inéditas, que quizá no se han dado nunca, o acaso muy raramente, en la naturaleza. Manipular mantiene aquí el sentido literal de trabajar con las manos; supone el conocimiento y dominio del material objeto de la manipulación. Valoraremos mejor el avance que esto supone si echamos una rápida ojeada a la historia reciente de la biología.

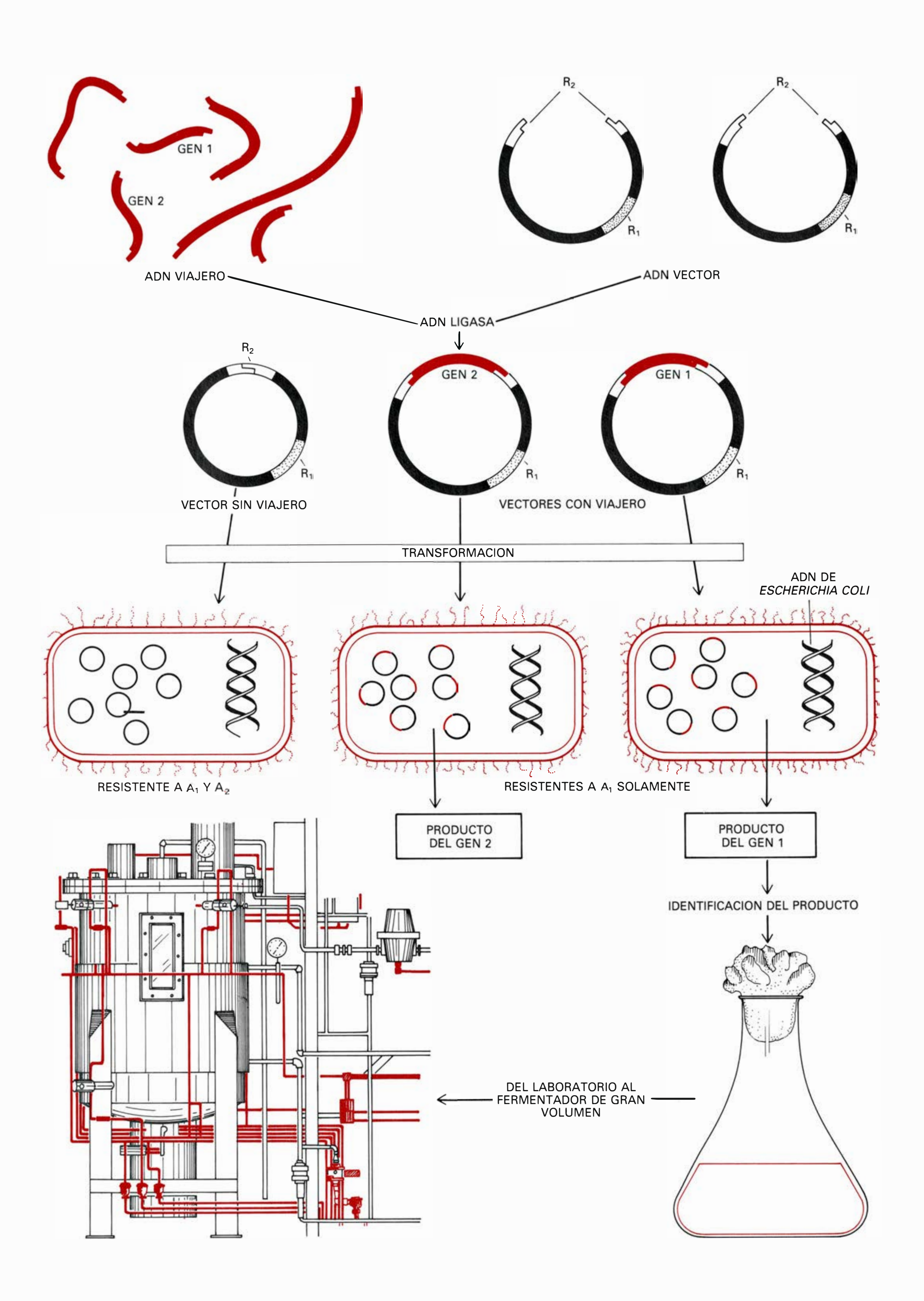
Al empezar la década de los cuarenta, no se había establecido todavía que el material genético fuese el ácido desoxirribonucleico (o ADN). En 1944, O. Avery y sus colaboradores, del Instituto Rockefeller, sugirieron que el material transformante de los *Pneumococcos*, capaz de conferir el carácter virulento heredable a una cepa avirulenta de esta bacteria, era ADN. Ese material, que 75 años antes aislara el bioquímico suizo J. Friedrich Miescher, no era, al parecer, un polímero tan uniforme como muchos de los investigadores de la época creían, sino que contenía información para alterar la herencia de una célula. Los experimentos con *Pneumococcos* demostraron una propiedad que a la postre resultó muy útil para el desarrollo científico que nos ocupa, esto es, que el ADN funcional, portador de especificidad genética, es transferible.

Ese descubrimiento estimuló las investigaciones sobre la composición y forma espacial de las moléculas de ADN. La elucidación de su estructura en doble hélice por J. D. Watson y F. Crick, en 1953, ayudaba a desvelar, al propio tiempo, el mecanismo por el que el ADN podía replicarse y, por tanto, perpetuarse. Cuando se extrae en forma nativa del núcleo de las células es un polímero de alto peso molecular, cuyas unidades estructurales son los nucleótidos, compuestos formados por un azúcar (la desoxirribosa), ácido fosfórico y una de las cuatro bases nitrogenadas cíclicas de tipo purínico o pirimidínico. Aunque el fosfato de desoxirribosa se repite monotónamente en cada uno de los miles de peldaños de la doble hélice, las cuatro bases se suceden de un modo ordenado, característico para cada organismo, a lo largo de su interior. El orden de las bases encierra la información transmisible del ADN. Las purinas son adenina (A) y guanina (G); y las pirimidinas, timina (T) y citosina (C). Los enlaces por puente de hidrógeno entre las bases complementarias A-T y G-C contribuyen a mantener unidas de modo estable las dos bandas de la doble hélice.

Más tarde, se caracterizó el ADN de numerosos microbios, animales y plantas. Salvo en algunos virus que contienen ácido ribonucleico (ARN) y que son excepciones interesantes, el material genético es siempre ADN. Aunque ello representa cierta simplificación de la realidad, podemos considerar a los genes como fragmentos de ADN.

La investigación prosiguió en su avance: se estableció el mecanismo en virtud del cual el ADN codifica una proteína. Este desarrollo de la expresión genética ocurre en dos etapas, llamadas de transcripción y traducción. En la transcripción, se copia la secuencia de nucleótidos de una de las bandas del ADN por el enzima ARN polimerasa, originando un polinucleótido complementario de ARN, cuya composición difiere de la del ADN por contener ribosa en vez de desoxirribosa y uracilo (U) en vez de timina. En la traducción, sucesivos tripletes (secuencia de tres nucleótidos) de un tipo especial de ARN (ARN mensajero) dictan el orden de los aminoácidos que, transportados por otro tipo de ARN (el ARN de transferencia), se unen sobre el ribosoma hasta formar la proteína completa. Es decir, la información para la síntesis de cualquier proteína se halla contenida en el orden o secuencia de las bases del ADN. Salvo pocas excepciones de interés, se trata de un código genético universal, lo que vale decir: podemos transferir el fragmento de

En este esquema se resumen las operaciones a realizar para obtener una proteína por ingeniería genética. El ADN viajero y el ADN vector han sido cortados por el mismo enzima de restricción, que ha originado dos poblaciones de moléculas, heterogénea en el caso del ADN viajero y homogénea en el ADN vector. En todas ellas, el enzima ha producido extremos de banda única con bases complementarias que permiten la formación de moléculas de ADN recombinantes. R1 y R2 representan los genes que codifican la resistencia a los antibióticos A1 y A2, respectivamente. El ADN vector se ha roto, de tal manera que se perderá la continuidad del gen R2. En la etapa 1, la mezcla de los ADN se liga con el enzima ADN ligasa. Entre varios tipos de moléculas que pueden formarse estarán las representadas en la figura: moléculas de ADN vector sin viajero y moléculas de ADN vector con viajero. Al transformar la bacteria E. coli *(etapa 2) las primeras conferirán a la bacteria la capacidad de resistir a los antibióticos A1 y A2, mientras que las que contienen ADN viajero, interrumpida la continuidad del gen R2, sólo conferirán resistencia a A1. Entre ellas debe identificarse el transformante en que se sintetiza la proteína deseada (etapa 3). A menudo, ello requiere laboriosos métodos de identificación de secuencias de ADN y de propiedades biológicas de la proteína expresada. Tras el proceso de caracterización en el laboratorio, deben encontrarse las condiciones adecuadas para el crecimiento de las bacterias en fermentadores de gran volumen. La purificación de la proteína es, en general, un prerrequisito para abordar las pruebas biológicas en animales y, en su caso, en humanos, al objeto de estudiar el rendimiento y posibles efectos colaterales del producto sintetizado. El esquema ilustra también cómo los conocimientos en varias áreas de la bioquímica, ingeniería y medicina deben coordinarse para completar el proceso con éxito.*



GEN 1
GEN 2
R_2
R_1
ADN VIAJERO
ADN VECTOR
ADN LIGASA
VECTOR SIN VIAJERO
VECTORES CON VIAJERO
TRANSFORMACION
ADN DE *ESCHERICHIA COLI*
RESISTENTE A A_1 Y A_2
RESISTENTES A A_1 SOLAMENTE
PRODUCTO DEL GEN 2
PRODUCTO DEL GEN 1
IDENTIFICACION DEL PRODUCTO
DEL LABORATORIO AL FERMENTADOR DE GRAN VOLUMEN

ADN que codifica una proteína en un organismo a otro distinto y esperar que, previa solución de algunos problemas técnicos, la misma proteína, dictada por el ADN intruso, se sintetice en la célula receptora.

Los investigadores tienen dos motivos para desear obtener un gen en grandes cantidades. Primero, estudiar detalladamente su estructura y función. Segundo, si el gen codifica una proteína de interés biológico, como puede ser una hormona que se produce en pequeñas cantidades en las células que lo fabrican de modo natural, espera lograr su expresión en otros sistemas celulares (bacterias que se multiplican abundantemente, por ejemplo) que, a modo de minúsculas maquinitas de producción, elaboren cantidades rentables de la misma hormona. Algunos de los problemas que este ambicioso proyecto plantea se han ido resolviendo gracias al esfuerzo de muchos investigadores. ¿Cómo obtener un gen interesante y dónde transferirlo para que la proteína que codifica se produzca de un modo rentable? Los bioquímicos disponen de dos estrategias que, a menudo, se complementan: el aislamiento y la síntesis.

El aislamiento requiere fragmentar el ADN del organismo de partida y separar del resto el trozo que interesa. Operación nada fácil, si consideramos que un gen puede comprender unos mil pares de bases, a separar del ADN total de la célula animal que contiene la friolera de mil millones. Cualquier procedimiento que inventemos para enriquecer el material de partida en las secuencias deseadas aliviará el trabajo posterior. La fragmentación del genoma puede conseguirse por rotura mecánica o, de modo más preciso, por la acción de algunos *enzimas de restricción*, proteínas que cortan el ADN por puntos bien definidos, allí donde se dan ciertas secuencias de nucleótidos.

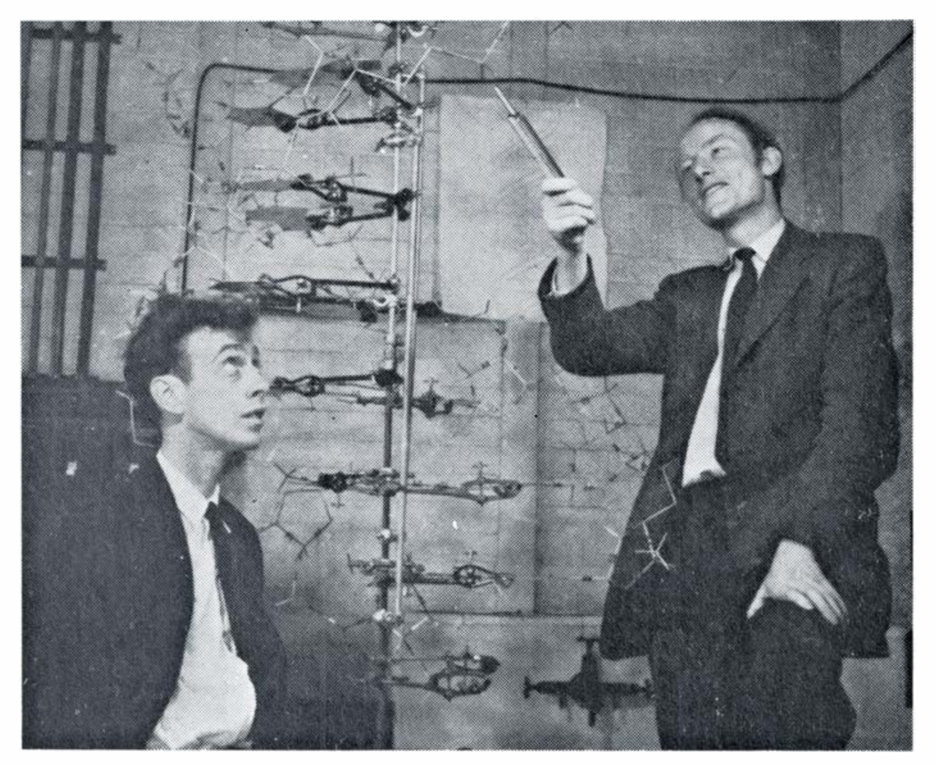
Tras esta operación, el gen de interés se hallará mezclado con una miríada de vecinos que, al menos por esta vez, no nos atraen. ¿Cómo separarlos unos de otros? El procedimiento ideado es único y esencial en ingeniería genética. Consiste en añadir a nuestra mezcla un ADN sencillo, capaz de replicarse en alguna célula; además, ha sido cortado con el mismo enzima de restricción que el ADN a fraccionar. Para el experimento suele escogerse uno de los enzimas que, al trocear ADN, deja en cada uno de los extremos del polímero una zona de banda única con secuencias de bases complementarias entre sí. La complementaridad entre extremos permite la formación de moléculas de ADN recombinantes entre el ADN sencillo, que denominamos vector, y un fragmento de entre nuestra población de genes, el ADN viajero.

Las dos moléculas, vector y viajero, se unen covalentemente en el tubo de ensayo mediante la acción del enzima ADN ligasa; pasan al interior de células vivas (se transfieren, como se dice en la jerga genética) en el proceso de transformación o transfección. Importa que la célula receptora adquiera, por la presencia del vector, alguna propiedad fácilmente reconocible. [Si el vector es un plásmido, o ADN circular extracromosómico de bajo peso molecular, resistente a un determinado antibiótico, y la célula receptora la enterobacteria *Escherichia coli*, aquél conferirá a nuestro colibacilo dicha propiedad frente al antibiótico en cuestión.]

Puede planearse el experimento de tal forma que podamos reconocer aquellas bacterias que transportan vector con viajero. Basta con que la inserción del viajero en la secuencia elegida del vector provoque la pérdida de resistencia a otro antibiótico. Los investigadores han ingeniado otras técnicas, tanto para el reconocimiento como para la selección de ADN recombinantes. Cada bacteria contiene y originará una progenie con un viajero distinto. A este proceso lo denominamos clonaje; existen varios modos de llevarlo a cabo, aunque no difieren en lo fundamental del aquí descrito. La identificación de las bacterias que acarrean como viajero el gen que nos interesa puede realizarse por métodos fisicoquímicos o biológicos y, aunque esta indagación resulta a menudo tediosa, a cualquier grupo que persista en su empeño le será fácil dar con su gen preferido.

Merced a la capacidad de replicación que ostenta el vector, el clonaje permite aislar y multiplicar (amplificar) un gen para su posterior estudio. Los vectores comúnmente empleados son virus, plásmidos o combinaciones de ambos. Se han preparado numerosos vectores artificiales aprovechando los métodos de ingeniería genética que ellos mismos han contribuido a desarrollar. Se dispone de vectores adecuados para la multiplicación de genes, no sólo en bacterias, sino también en levaduras y células de animales y plantas. Se están sintetizando vectores universales, aptos para multiplicarse en muchos tipos de células. El conjunto de ADN recombinantes formado por un vector y los diferentes genes de un organismo constituye la biblioteca de genes del organismo. Existen muchas bibliotecas de genes, incluida la del hombre.

Con frecuencia resulta más cómodo y rápido sintetizar un gen por métodos químicos o enzimáticos. La síntesis química, que implica la unión ordenada de nucleótidos hasta reproducir la secuencia deseada, se hace laboriosa para ADN largos. Requiere conocer de an-



*El primer modelo del ADN con sus descubridores, J. D. Watson (***izquierda***) y F. H. C. Crick. La fotografía fue tomada en el laboratorio Cavendish, de Cambridge, en la primavera de 1953. El conocimiento detallado de la estructura del ADN y de los enzimas para cortarlo y ligarlo alumbró el nacimiento de la ingeniería genética.*

temano la secuencia del gen y sus productos de expresión. Ello no obstante, suele escogerse en síntesis de fragmentos cortos de ADN con secuencias interesantes, como pueden ser segmentos de genes para cuyo aislamiento le servirá después al investigador, o bien señales de expresión genética. Los laboratorios poseen ya máquinas sintetizadoras de ácidos nucleicos que impulsarán el empleo de esta metodología.

La síntesis enzimática, cuyo uso está muy extendido, consiste en la copia por el enzima transcriptasa inversa del ARN mensajero para formar un ADN complementario al mismo; ese ácido desoxirribonucleico se insertará luego en un vector adecuado por métodos análogos a los descritos arriba. A veces se podrá enriquecer el ARNm de partida que queremos copiar; verbigracia: por selección de un cierto tamaño molecular o por la adecuada elección del tejido biológico. La transcriptasa inversa fue descubierta por H. Temin y D. Baltimore a finales de los años sesenta en partículas de ciertos virus oncogénicos. Además del interés teórico y práctico que tuvo la demostración del proceso inverso al que se dan en la primera etapa de la expresión genética, la reacción ha resultado utilísima en ingeniería genética por una razón que durante aquellos años no se sospechaba: en muchos genes eucarióticos, las secuencias codificantes se hallan interrumpidas por segmentos de ADN, no representados en la secuencia del ARNm maduro, pero sí en los productos primarios de transcripción que luego deben procesarse para formar el ARNm activo en la fase de traducción. A menos que los enzimas de procesamiento se den en las células receptoras de ADN recombinantes, no es posible obtener la proteína activa por falta de ARNm maduro. El problema se evita, precisamente, formando en el tubo de ensayo un gen artificial por copia del ARNm con la transcriptasa inversa. El método de síntesis enzimática es, a menudo, complementario al de aislamiento. Y así, el ADN obtenido por transcriptasa inversa se ha empleado para detectar el correspondiente gen nativo en una librería de genes.

El clonaje ha permitido producir, por primera vez, cantidad suficiente de genes específicos y de regiones adyacentes para determinar su secuencia completa de nucleótidos con el recurso a técnicas rápidas de secuenciación de ADN por los métodos de degradación química, de A. Maxam y W. Gilbert [véase: "Proteínas útiles obtenidas a partir de bacterias recombinantes", por Walter Gilbert y Lydia Villa-Komaroff; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, junio de 1980], y de síntesis enzimática, de F. Sanger y colegas.

Como ejemplo, podemos referirnos al trabajo, hoy ya clásico, del clonaje del gen de la insulina de ratón en 1977 por A. Ullrich, J. Shine, W. Rutter, H. Goodman y colegas. Su estrategia comportaba recabar una minuciosa selección de los islotes de Langerhans productores de la insulina como fuente del ARN mensajero, que se copió con transcriptasa inversa. Se clonaron luego ciertas secuencias del ADN resultante, abundantemente representadas en la población. Se demostró, por comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína, que correspondían realmente al gen de la insulina. Insulinas de otras especies, incluida la huma-

na, se han clonado en varias industrias, de entre el centenar que han surgido en los últimos años.

Para comprender la organización y modo de expresión de un gen es conveniente, a menudo, modificarlo de modo controlado y preciso y reintroducirlo en el organismo de origen. Los métodos de mutagénesis dirigida permiten eliminar, agregar o cambiar bases preseleccionadas, a fin de obtener colecciones de genes modificados o mutantes. Asimismo, es posible fusionar genes distintos o fragmentos de genes y lograr un repertorio de nuevos productos que quizás encierren propiedades insospechadas.

El área de investigación no se circunscribe a lo anterior. La secuenciación de genes para una misma proteína, pero de organismos distintos, ha impulsado los estudios de evolución molecular. El empleo de ADN clonados comienza a desvelar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión durante el proceso de desarrollo de un organismo. En definitiva, la ingeniería genética se ha convertido en un auxiliar de gran valor en biología.

Dado el énfasis práctico de este volumen, quisiera extenderme sobre el concepto de aprovechamiento de un gen, incluido en la definición dada al comienzo. Aunque las posibilidades de programar bacterias para ejercer actividades complejas, como metabolizar residuos tóxicos, fijar nitrógeno atmosférico e incluirlo en el proceso de biosíntesis de ciertas proteínas, etcétera, no pueden ignorarse, la aplicación inmediata de la ingeniería genética ha sido la fabricación en gran escala de proteínas empleadas como medicamentos, que hasta ahora sólo se han podido conseguir en pequeña cantidad a partir de los órganos o tejidos que las producen. Los ejemplos más comentados han sido el clonaje y síntesis en *E. coli* de ciertas hormonas (insulina, somatostatina y hormona de crecimiento), antígenos virales (virus de la hepatitis) y determinadas proteínas con propiedades antivirales y quizás anti-tumorales denominadas interferones. Los interferones se producen por algunas células del cuerpo de los vertebrados en respuesta a ciertos agentes externos, incluidos virus [véase: "El interferón", por Derek C. Burke; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA; junio de 1977]. Las cantidades de interferón asequibles para estudios biológicos y médicos era, hasta hace poco, limitadísima. T. Taniguchi, S. Nagata, C. Weissmann y sus colegas lograron hace dos años el clonaje y la expresión en *E. coli* de algunos interferones humanos. Muchos gramos de interferón puro serán pronto asequibles y su administración permitirá, por primera vez, evaluar cuál es el efecto de estas proteínas, cuando se administran a dosis elevadas, y su potencial como agentes terapéuticos.

¿De qué modo se puede forzar a una bacteria para que produzca, en grandes cantidades, una proteína que le es extraña? Volvamos a nuestro ADN viajero, que esto es lo que son los genes que codifican una hormona o el propio interferón. La transcripción eficiente del ADN viajero depende de cierta secuencia de nucleótidos que denominamos promotor y que, idóneamente, debe situarse sobre el vector, cerca del comienzo del gen a expresar. Sintetizado el ARN mensajero, éste debe incluir una señal de unión al ribosoma no muy

alejada del punto de iniciación de traducción. Ni siquiera cumplidas todas estas condiciones, y con otros detalles bien controlados, se puede predecir, sin riesgo a equivocarse, cuál será el rendimiento, en función de su expresión, de un determinado gen. Existen numerosos promotores y son muchas las variantes en las señales que podemos introducir sobre el ADN. La optimación de los sistemas de expresión constituye una de las áreas de investigación activa de ingeniería genética. Lo que sí está claro es que la bacteria se multiplica hasta densidades de miles de millones (10^9) de células por centímetro cúbico. Propongo al lector unos cálculos sencillos: averiguar el número de bacterias en un fermentador de 100.000 litros; deducir el peso total de las bacterias obtenidas, sabiendo que la masa de una de ellas es de 2×10^{-12} g; finalmente, supóngase que una hormona producida en el cultivo representase entre el 0,1 y el 1 por ciento del peso total. Aun contando con que en su purificación se perdiera el 90 por ciento, obtendríamos... ¡Y algunas proteínas expresadas constituyen entre el 10 y el 20 por ciento del total de la proteína de *E. coli*! No sorprende que exista la esperanza de que el coste de algunos de los productos mencionados se reduzca hasta cien veces con la nueva metodología.

Todo ha ocurrido en menos de cuarenta años: el reconocimiento del ADN como material genético, la preparación de enzimas capaces de fragmentarlo y unirlo, el descubrimiento de la transcriptasa inversa, los métodos de síntesis química de polinucleótidos y la puesta a punto de los métodos de secuenciación de ADN. El resultado ha sido la construcción de pequeñas factorías vivientes programadas para sintetizar productos útiles. Esperemos que los portentosos microbios sirvan para aliviar los grandes problemas de alimentación y sanidad planteados en todo el mundo y no sólo para aumentar los beneficios de los países desarrollados. (Esteban Domingo.)

Biotecnología en España

La biotecnología española se caracterizó, tiempo atrás, por un notable retraso en la implantación a nivel industrial de los procesos microbiológicos, excepción hecha del sector vinícola, donde existía una gran tradición, si bien sus procedimientos eran y siguen siendo en gran medida puramente empíricos. Sólo puede hablarse de un auténtico despegue de las industrias de fermentación en nuestro país a partir del final de la guerra civil.

En el campo de la producción de antibióticos resultó decisiva, a comienzos de la década de los años cincuenta, la programación a nivel estatal, tendente al establecimiento de un número limitado de plantas de fabricación de antibióticos que gozaron de cierta protección en el mercado interior.

Pero en los últimos años la biotecnología nacional ha sufrido los mismos avatares económicos que la actividad industrial de otros sectores, si bien no ha padecido un retraimiento del mercado en el mismo grado que otros ámbitos de la producción: el siderúrgico, el naval o el automovilístico, por ejemplo. Los posibles desequilibrios derivados de un encarecimiento sostenido de la mano de obra, de la energía y de las materias primas, así como la desaparición progresiva del proteccionismo arancelario frente a la competencia de las poderosas industrias multinacionales del ramo, se han ido superando.

En general, y a pesar de la crisis mundial, el balance comercial de estas empresas, salvo alguna excepción, es positivo. Esto indica que sus productos son competitivos a nivel nacional e internacional, como lo corrobora el que una parte significativa de la producción del sector se dedica a la exportación.

El estado actual de la biotecnología en nuestro país refleja el estado general de la situación de la industria química y farmacéutica. Hay un número reducido de empresas españolas y una proliferación mayor de laboratorios nacionales o pertenecientes a las multinacionales farmacéuticas, algunos de los cuales incluyen una pequeña parte de producción por métodos de fermentación. Afortunadamente, algunas de las empresas españolas en el área de la fermentación poseen instalaciones industriales y niveles de producción parangonables con las multinacionales del área de la biotecnología.

Entre las empresas en el campo de la producción de antibióticos cabe destacar a ANTIBIÓTICOS, S. A., cuya planta de fermentación está localizada en León, y a la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos (CEPA), S. A., perteneciente al grupo de Unión de Explosivos Río Tinto (ERT), con planta en Aranjuez; ambas se fundaron en 1952. Cyanamid Iberica, S. A. (LEDERLE), produce también tetraciclina en sus laboratorios de San Sebastián de los Reyes (Madrid).

En el campo de la producción de aminoácidos destaca PENIBERICA, S. A., dependiente de ANTIBIÓTICOS, S. A., con una planta en Pamplona, dedicada fundamentalmente a la producción de ácido glutámico, e Ingeniería Química de Tarragona, S. A. (IQTSA), que está levantando una planta de producción de lisina en Valencia de Don Juan (León).

Vista aérea de la planta de ANTIBIOTICOS, S. A. Las naves blancas en el centro del complejo, con una altura aproximada de tres a cuatro pisos, albergan los fermentadores de 285.000 litros. En los edificios adyacentes se llevan a cabo los procesos de recuperación de productos y fabricación de derivados semisintéticos. El resto de los edificios están destinados a laboratorios de investigación y servicios.

Una tercera compañía implicada en la producción de aminoácidos es la Sociedad de Desarrollo Técnico e Industrial (SODETI), dependiente al 50 por ciento del Instituto Nacional de Industria y de Elf-Aquitaine, que produce DL-metionina en su fábrica de Burgos, si bien este proceso no se lleva a cabo por fermentación, sino por síntesis química, ya que en el caso particular de la metionina puede, excepcionalmente, utilizarse para la alimentación animal la mezcla racémica (DL-metionina), en lugar de los isómeros L de los aminoácidos que son normalmente requeridos y que sólo pueden obtenerse de forma rentable por fermentación.

En el campo de la producción por fermentación de ácidos orgánicos destaca la Compañía Ayuso, S. A., de Montmeló (Barcelona). La conversión microbiana de esteroides la está desarrollando la Compañía Española de Síntesis Química (CESQUISA), S. A., en Segovia, y la Compañía Española de Petróleos (CEPSA), en Torrejón de Ardoz (Madrid). Otros laboratorios, como ABELLO, S. A., están dedicados a la producción de alcaloides, un campo que podría ampliarse con la producción por microorganismos de alcaloides del cornezuelo.

En el área de las industrias de fermentación alcohólica y de producción de levadura de panadería, destaca la Unión General Alcoholera, con plantas en Madrid y en varias otras ciudades españolas, así como el grupo bastante numeroso de industrias cerveceras y vinícolas. Otro conjunto importante lo constituyen los laboratorios especializados en productos de uso veterinario o agrícola, todos ellos de pequeño volumen, si bien algunos han desarrollado vacunas aceptadas internacionalmente.

Aun cuando no cabe hacer un estudio pormenorizado de los distintos laboratorios que operan en España, es obvio concluir que en nuestro país existe una infraestructura a un nivel internacionalmente aceptable en el campo de las industrias biotecnológicas. Incluso en algún caso, como es el de ANTIBIÓTICOS, S. A., el volumen de producción de la planta se encuentra entre los cinco mayores del mundo en su campo. Su capacidad de producción supera los 3800 metros cúbicos, disponiendo de fermentadores de hasta 285 metros cúbicos. Esta empresa cuenta con 1200 empleados y tiene un consumo de energía en planta de 10 millones de kilowatt por mes; produce 40 productos químicos diferentes, exportando más del 70 por ciento de su producción total.

¿Cuáles son las perspectivas futuras para las industrias de fermentación? En primer lugar, importa señalar que España posee condiciones aceptables para el desarrollo y la consolidación de las industrias de fermentación. Estas industrias utilizan fundamentalmente materias primas derivadas de productos agrícolas; y entre las principales que sirven de fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los microorganismos señalaremos: (*1*) melazas, un subproducto de la fabricación de azúcar de caña o de remolacha; (*2*) extracto de maceración del maíz, un subproducto de la fermentación ácida del maíz; (*3*) productos solubles de destilerías, que son los residuos obtenidos después de la destilación del alcohol a partir de granos fermentados; (*4*) almidón, dextrinas y glucosa, obtenidos por hidrólisis del almidón; (*5*) diversas harinas, como son las de algodón, soja, maíz, etcétera; (*6*) aceites (soja, girasol e incluso grasas animales); y (*7*) urea y sulfato amónico (o hidróxido amónico). España posee una infraestructura y un desarrollo agrícola que hacen posible la existencia de un suministro interior continuado de estas materias primas.

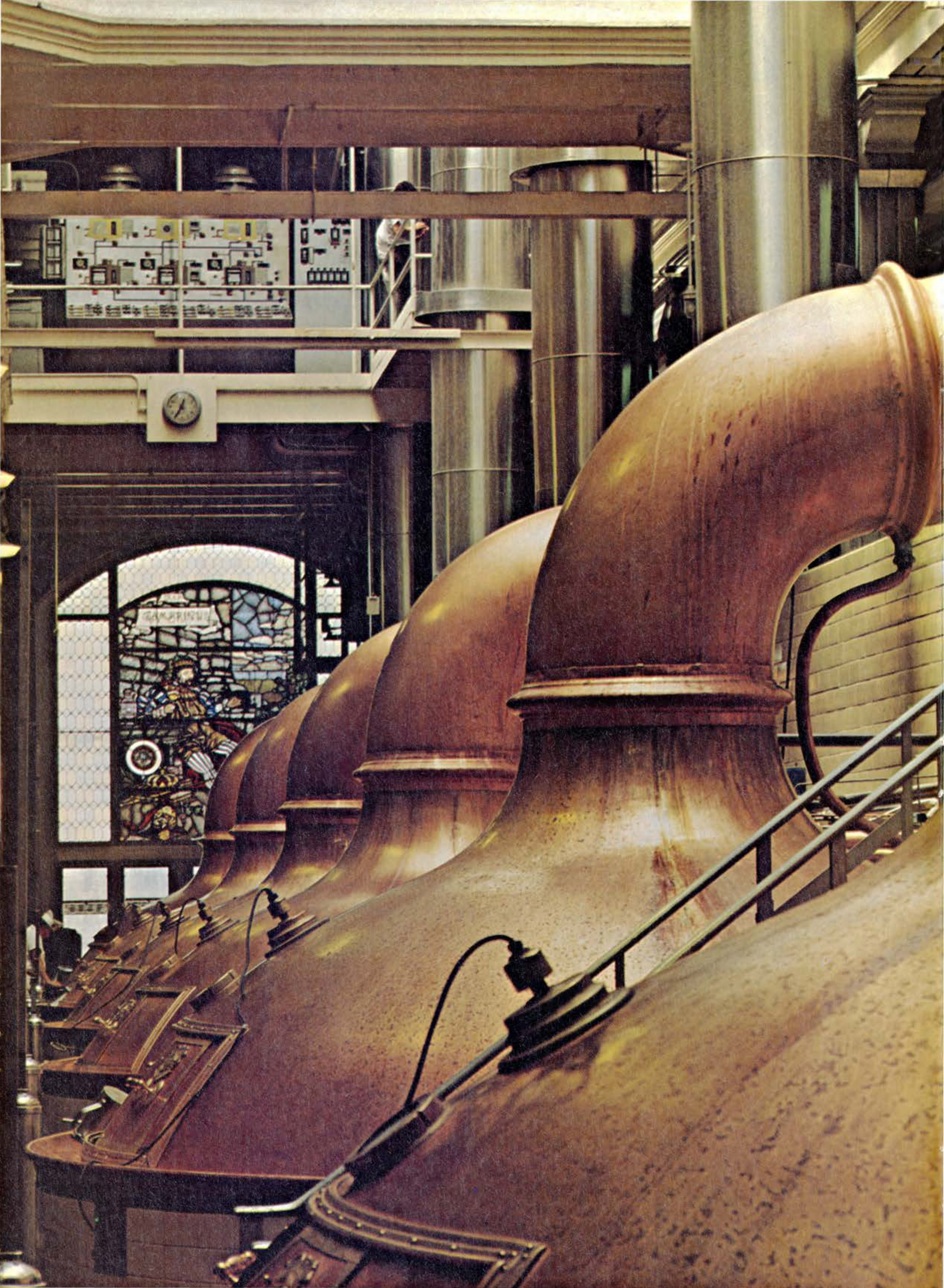
Por fortuna para nuestra balanza comercial, las industrias de fermentación requieren un alto grado de tecnificación (pero sólo en aspectos concretos se trata de tecnología de vanguardia), lo que dificulta el establecimiento de industrias de fermentación competitivas en algunos países en vías de desarrollo. Podríamos citar ejemplos de instalaciones industriales, asentadas en nuestra área lingüística, que han incorporado tecnología extranjera que han encontrado no pocas dificultades a la hora de conseguir un funcionamiento eficiente, al no dominar los aparatos en cuestión. Es innegable que en España existen en este momento los cuadros de personal técnico necesarios para la asimilación, optimización e incluso superación de la tecnología de fermentación.

Existe, sin embargo, cierta tecnología de vanguardia para el desarrollo de las industrias de fermentación –las técnicas de ingeniería genética–, que exige una especial formación científica. Interesa señalar que la tecnología del ADN recombinante, a diferencia de otras tecnologías del campo de la física o de la química, no requiere cuantiosas inversiones en equipo, sino solamente laboratorios bien dotados en biología molecular y personal preparado. Podemos vanagloriarmos de disponer de un plantel excelente de científicos formados en los mejores laboratorios de Estados Unidos, Inglaterra, Alemania y Francia. Esos cuadros podrían incorporarse fácilmente en la industria o participar en proyectos de colaboración especiales, como demuestra el caso de INGENESA o los grupos de investigación que trabajan en proyectos coordinados, adscritos a la Universidad Autónoma de Madrid, al Centro Ramón y Cajal de la Seguridad Social y al nuestro de la Universidad de León.

Ahora bien, en este contexto, pueden surgir roces entre la comunidad científica y la industrial. Los investigadores de las especialidades llamadas básicas han vivido, tradicionalmente, en una torre de marfil, alejados de los aspectos prácticos de la ciencia; por su parte, la industria ha mostrado muy poco interés en entender qué les preocupaba a los científicos en su afán por dilatar las fronteras de su especialidad y en hacer partícipes a los demás de sus hallazgos. La industria española, muy apegada a mantener absolutamente secreto su "know-how" (que casi siempre está descrito con todo lujo de detalles en la bibliografía científica o en las patentes de países avanzados y, que, por tanto, carece de sentido mantener secreto), deberá cambiar su proceder si quiere atraer la colaboración de buenos científicos.

En resumen, a corto plazo España posee la infraestructura, las materias primas, la tecnología y el personal científico y técnico adecuado para acelerar el desarrollo de la biotecnología. No es seguro, sin embargo, que este potencial sepa aprovecharse. Existe un interés manifiesto por parte de algunas industrias del sector o ajenas a él, tales como CEPSA O EMPETROL (petroquímicas), que están desarrollando programas en el área de la biotecnología. Pero el desarrollo de este sector industrial puede verse frenado por la atonía inversora que afecta a todos los campos de la actividad económica.

A largo plazo, los pronósticos resultan más arriesgados. Todo depende de que la empresa privada y la estatal se decidan a subirse al tren del avance de la biotecnología. Pensemos que, a nivel internacional, numerosas compañías norteamericanas, inglesas, suizas e incluso francesas y canadienses (GENETECH, CETUS, BIOGEN, GENETICA, por citar solamente algunas de las más representativas) han sido establecidas específicamente para el desarrollo a nivel industrial de las técnicas de ingeniería genética. Aun cuando se discute la viabilidad de algunas de estas compañías a la larga, está claro que otras multinacionales (ELI LILLY, ICI, MERCK SHARP & DOHME) se beneficiarán de los proyectos desarrollados en colaboración con las primeras. (Juan F. Martín.)



Producción microbiológica de alimentos y bebidas

La intervención microbiana en la fabricación de cerveza, vino, pan y queso se remonta hasta el Neolítico. Más inmediata es su participación en otras bebidas alcohólicas, yogur, aceitunas, pepinillos, col ácida y proteínas unicelulares

Anthony H. Rose

Los microorganismos mejoraron y echaron a perder los alimentos y bebidas destinados al consumo humano mucho antes de que se reconociera su existencia. Andando el tiempo, y sin saber todavía qué sucedía a nivel biológico, la gente aprendió a fomentar y explotar la acción fermentativa de los microorganismos en la fabricación de alimentos tales como el queso y la cerveza. Desvelada ya en lo esencial la actividad microbiana, los alimentos y bebidas fermentados constituyen hoy un sector muy extenso e importante de la industria alimentaria. Con el desarrollo de las técnicas de programación genética, abordadas por David A. Hopwood en el artículo precedente, son de esperar avances a gran escala en la calidad y exactitud de la producción microbiológica de alimentos y bebidas.

Uno de los primeros productos del campo fue, a buen seguro, la leche. Y puesto que ella sufre una rápida invasión bacteriana que la acidifica, al convertir su azúcar (lactosa) en ácido láctico, es de suponer que el queso se contaría entre los primeros alimentos fermentados. Durante milenios, se ha venido explotando y desarrollando gradualmente este proceso espontáneo para la fabricación de quesos y productos derivados. Hoy, la comercialización de productos lácteos ocupa el segundo puesto en volumen de ventas, precedida sólo por las bebidas alcohólicas, dentro del subsector industrial que se basa en los procesos microbiológicos.

La fabricación de queso consiste, fundamentalmente, en añadir a la leche un cultivo de bacterias, dejando incubar la mezcla cierto tiempo. Se agrega luego un enzima proteolítico (enzima que digiere las proteínas) para coagular los sólidos durante la acidificación de la leche. Tradicionalmente, el cuajo, o renina, obtenido del cuarto estómago de terneras destetadas, constituía la fuente de enzimas, pero se le va sustituyendo por enzimas microbianos. Se separa del suero la cuajada, se prensa para expulsar el agua y se envuelve en una tela seca. En algunos quesos se favorece el crecimiento de microorganismos en su parte externa durante el proceso de curado.

Cien años atrás, el arte de fabricar quesos había alcanzado una fase notable de desarrollo: el industrial no dependía ya de la infección espontánea de la leche por bacterias, sino que explotaba una o varias especies de bacterias, cultivadas ex-profeso para iniciar la formación del queso. La naturaleza de las bacterias que se emplean como iniciadores constituye uno de los factores que determinarán la extensa gama de quesos. Otros factores son la temperatura de fabricación y la presencia o ausencia de una flora secundaria.

Los quesos blandos poseen un alto contenido en agua (del 50 al 80 por ciento); se agrupan en madurados y no madurados. Un queso blando madurado es un producto que, terminado, viene a tener una consistencia parecida a la de los primeros pasos del proceso; así, el cottage cheese, o queso de granja. En un queso blando no madurado, el Camembert o Brie, por ejemplo, se favorece el crecimiento en superficie de levaduras y especies del moho *Penicillium*. En un queso semiduro, la cuajada se calienta brevemente para rebajar el contenido de humedad hasta el 45 por ciento, lo que la hace más firme. Algunas variedades (Caerphilly, por ejemplo) tienen un aroma a cuajada fresca; otras (como el Limburger) se empapan en salmuera, que aporta una flora superficial de bacterias y levaduras.

Los quesos duros, cuyo contenido hídrico no rebasa el 40 por ciento, pueden gozar de una flora bacteriana simple, como el queso Cheddar. Los hay también que se caracterizan porque se inocula la cuajada con esporas de mohos (generalmente *Penicillium roqueforti*), que germinan cuando se pincha la cuajada para dejar entrar aire. El crecimiento de los mohos en los quesos genera los compuestos de aroma y sabor que distinguen a cada tipo: Stilton, queso azul danés, Roquefort y Gorgonzola, entre varios. Peculiar de una tercera clase de quesos duros, que incluye el Gruyère, es el hecho de mezclar los cultivos iniciadores y bacterias productoras de ácido propiónico. Estas bacterias, de las que podemos citar la especie *Propionibacterium shermanii*, no sólo confieren al producto las características de sabor, sino que producen dióxido de carbono, gas que origina los agujeros típicos de la clase. Pertenecen a este grupo los quesos suizos de montaña; en ellos, además, se desarrolla una flora superficial de levaduras y bacterias que contribuyen a su sabor y aroma.

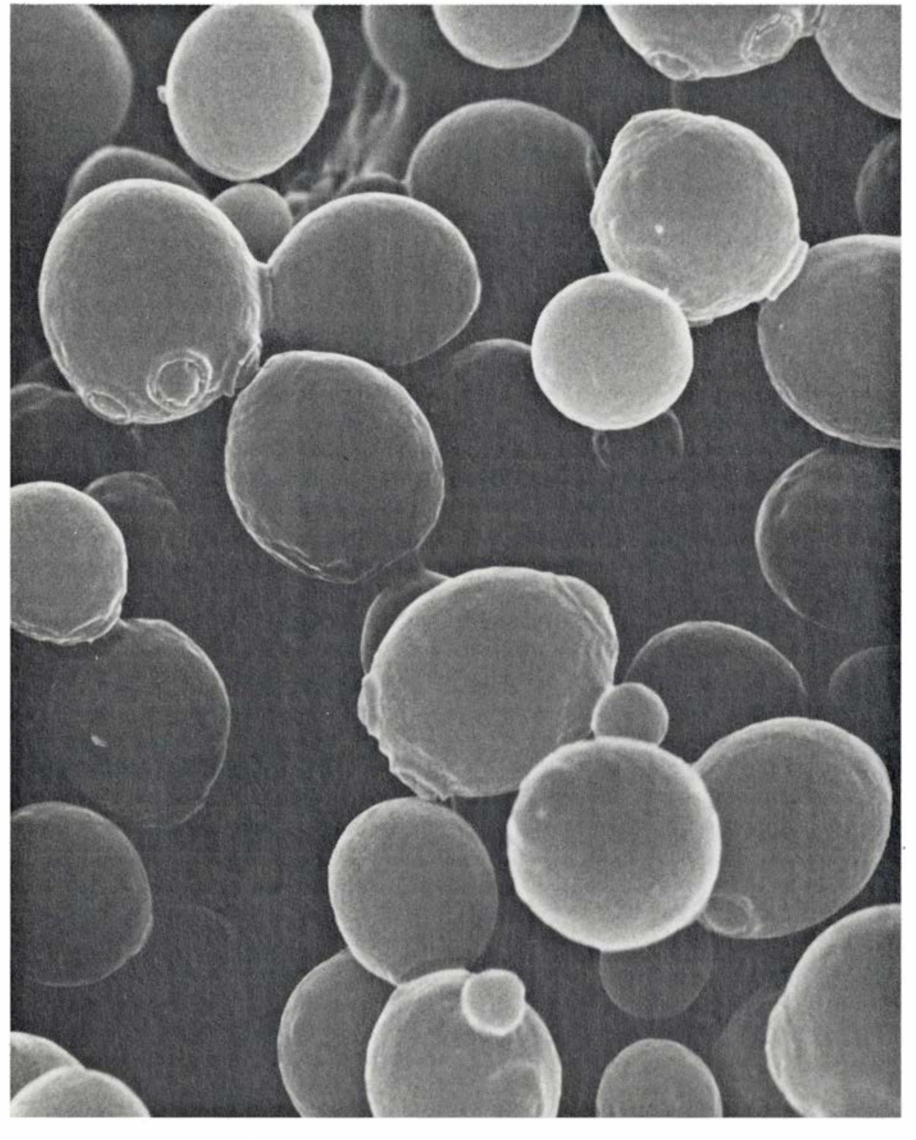
Otros productos lácteos fermentados son líquidos o semilíquidos. El miembro más popular de esta clase es el yogur, que se fabrica fermentando leche entera con una mezcla simbiótica de dos bacterias lácticas, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgari-*

CALDERAS DE COBRE empleadas en la fabricación de cerveza por la Pabst Brewing Co., de Milwaukee. En ellas tiene lugar el proceso de cocción. El material que se hierve es el mosto, un extracto acuoso de cebada germinada, al que se añade lúpulo para dar sabor a la cerveza. Más tarde, el mosto se coloca en tanques y es fermentado por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. La cocción en calderas de cobre ya formaba parte de la antigua tecnología de elaboración de cerveza; tecnología que se ha beneficiado, también, de los avances de la ciencia, como da fe el panel de control situado encima de la vidriera. La figura, el rey Gambrinus, es un soberano mitológico que se tiene por providente benefactor de la cerveza.

cus. La fermentación transcurre a una temperatura en torno a los 40 grados Celsius. El aroma característico del yogur hay que atribuírselo al ácido láctico, producido a partir de la lactosa de la leche y al acetaldehído; ambos deben su formación, principalmente, a la bacteria *L. bulgaricus*. Como mucha gente no siente especial predilección por la acidez ni el aroma a acetaldehído del yogur fresco, el producto suele aromatizarse con frutas o esencias de frutas. Más del 90 por ciento del yogur producido en Occidente se aromatiza así.

Relacionados con el yogur encontramos múltiples productos lácteos fermentados. Así, la nata o crema ácida se fabrica acidificando nata pasteurizada con bacterias productoras de ácido láctico. La leche de manteca se obtiene fermentando leche pasteurizada desnatada, o parcialmente desnatada, con una mezcla de varias bacterias lácticas. Entre los productos más exóticos dentro de esta categoría citaremos la leche búlgara, el kefir y el koumis, populares en los países eslavos, y el vilia finlandés.

Un proceso originado por la actividad microbiana, y conocido desde antiguo, es la conservación de vegetales por fermentación. Utilizado mucho antes del comienzo del enlatado y la congelación, se practica aún a escala comercial en muchos países. En particular, aceitunas, pepinillos y col ácida se conservan por una combinación de fermentación y tratamiento con salmuera. El vegetal se trata en sucesivas salmueras que contienen diferentes concentraciones de sal. La concentración final va desde un 2 por ciento para la col hasta el 18 por ciento para las aceitunas. (Puede requerirse algún pretratamiento; por ejemplo, las aceitunas contienen un glucósido fenólico extremadamente amargo llamado aleuropeína, para cuya eliminación se tratan las aceitunas con una solución diluida de hidróxido sódico, antes de colocarlas en salmuera.)



LA BESTIA DE CARGA de la fermentación es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, cuyas células aparecen en esta micrografía de barrido, obtenida por Alastair T. Pringle, de la Universidad de California en Los Angeles. Las células miden alrededor de 10 micrometros de diámetro. Para fabricar pan y bebidas alcohólicas se utilizan cepas de esta levadura. Al fermentar los azúcares, las células producen dióxido de carbono y alcohol; en la masa, el dióxido de carbono forma los agujeros del pan. Algunas de las células están en gemación (empezando a reproducirse) y se observan asimismo cicatrices de algunas yemas.

Mientras los vegetales permanecen en salmuera se hallan sometidos a la acción de una cadena de microorganismos. Predomina en un comienzo el crecimiento de la flora microbiana aerobia, que estaba en la superficie de los vegetales antes de su introducción en salmuera. Pero muy pronto las bacterias lácticas, que estaban al principio en minoría, se hacen con la situación y, junto con ciertas levaduras fermentativas (especies de *Saccharomyces* y *Torulopsis* incluidas), llevan a cabo una fermentación que produce ácido láctico y ácido acético. Más tarde, las levaduras predominan sobre las bacterias lácticas. La fermentación cesa en cuanto se han consumido todos los hidratos de carbono fermentables. Lo que no empece que otras especies de levaduras (principalmente de los géneros *Pichia, Debaromyces* y *Candida*) continúen desarrollándose y formen una película superficial sobre la salmuera. Para no depender de la flora natural de bacterias y levaduras presentes en los vegetales y salmuera, se ha ensayado la introducción de cultivos iniciadores de determinadas bacterias lácticas, lo que permitirá un mejor control de la fermentación.

El motivo principal de que la leche y los vegetales se fermenten yace en la voluntad de conservar sus propiedades nutritivas, mientras que el crecimiento de microorganismos en otros tipos de alimentos fermentados tradicionales se impulsa, principalmente, para mejorar su gusto y aroma. Al propio tiempo, el crecimiento de microorganismos aumenta el contenido proteico de estos alimentos. En este grupo se encuadran los alimentos fermentados originarios de Oriente, que contienen pescado o materia vegetal (particularmente soja) como ingrediente básico. Los productos de pescado fermentado están aún muy limitados a un consumo local en países orientales, pero los derivados de la fermentación de la soja se han ido extendiendo progresivamente, en particular entre las comunidades orientales de América septentrional.

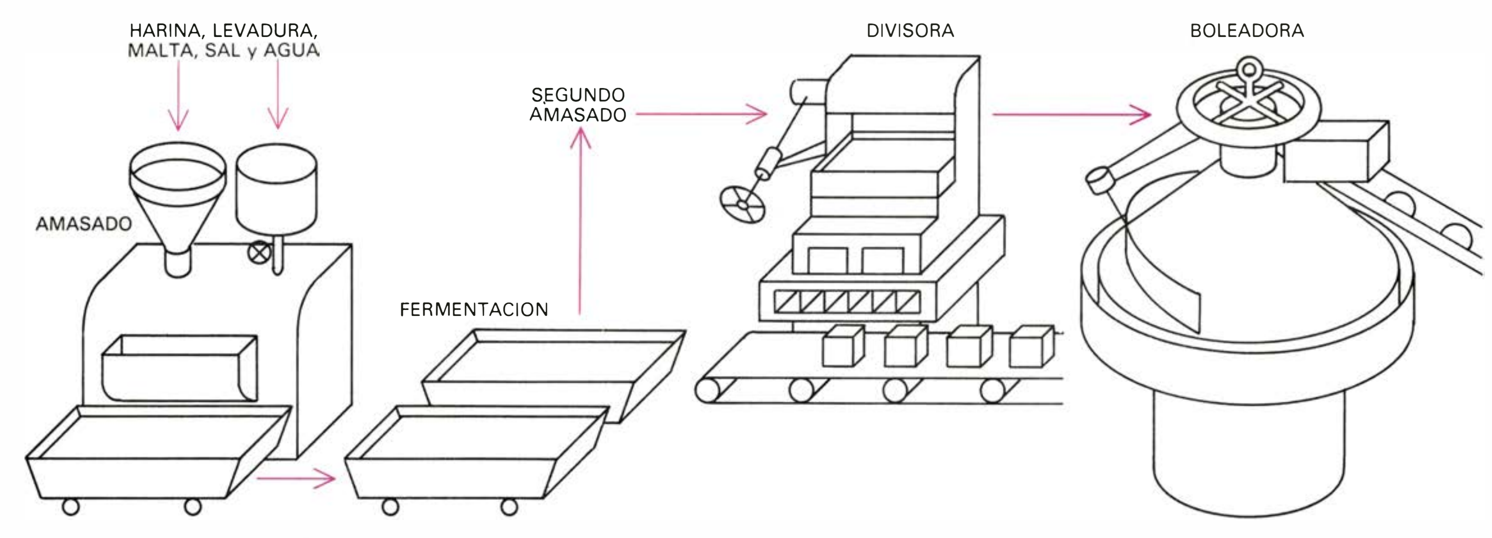
Dentro de este grupo de alimentos son típicos los tempehs. Con ese nombre se designa un pastel compacto de un producto vegetal, completamente cubierto y atravesado por un micelio blanco de especies de mohos del género *Rhizopus*. La palabra que siga al voca-

QUESO	ORIGEN	MICROORGANISMO		
BLANDO, NO MADURADO				
COTTAGE CREAM NEUFCHATEL	¿EUROPA CENTRAL? EE.UU. FRANCIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris* *Streptococcus diacetilactis*	*Leuconostoc citrovorum*	
BLANDO, MADURADO				
BRIE	FRANCIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium camemberti* *Penicillium candidum*	*Brevibacterium linens*
CAMEMBERT	FRANCIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium camemberti* *Penicillium candidum*	
LIMBURGER	BELGICA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Brevibacterium linens*	
SEMIBLANDO, MADURADO				
ASIAGO	ITALIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris* *Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus bulgaricus*	
BLUE	FRANCIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium roqueforti* o *Penicillium glaucum*	
BRICK	EE.UU.	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Brevibacterium linens*	
GORGONZOLA	ITALIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium roqueforti* o *Penicillium glaucum*	
MONTERREY	EE.UU.	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*		
MUENSTER	ALEMANIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Brevibacterium linens*	
ROQUEFORT	FRANCIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium roqueforti* o *Penicillium glaucum*	
DURO, MADURADO				
CHEDDAR	GRAN BRETAÑA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris* *Streptococcus durans*	*Lactobacillus casei*	
COLBY	EE.UU.	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris* *Streptococcus durans*	*Lactobacillus casei*	
EDAM	HOLANDA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*		
GOUDA	HOLANDA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*		
GRUYERE	SUIZA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus helveticus*	*Propionibacterium shermanii* o *Lactobacillus bulgaricus* y *Propionibacterium freudenreichi*
STILTON	GRAN BRETAÑA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris*	*Penicillium roqueforti* o *Penicillium glaucum*	
SUIZO	SUIZA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus helveticus*	*Propionibacterium shermanii* o *Lactobacillus bulgaricus* y *Propionibacterium freudenreichi*
MUY DURO, MADURADO				
PARMESANO	ITALIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus cremoris* *Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus bulgaricus*	
ROMANO	ITALIA	*Lactobacillus bulgaricus*	*Streptococcus thermophilus*	
PASTA FILATA (CUAJADA MOLDEABLE)				
MOZZARELLA	ITALIA	*Streptococcus lactis* *Streptococcus thermophilus*	*Lactobacillus bulgaricus*	
PROVOLONE	ITALIA	*Lactobacillus bulgaricus*		

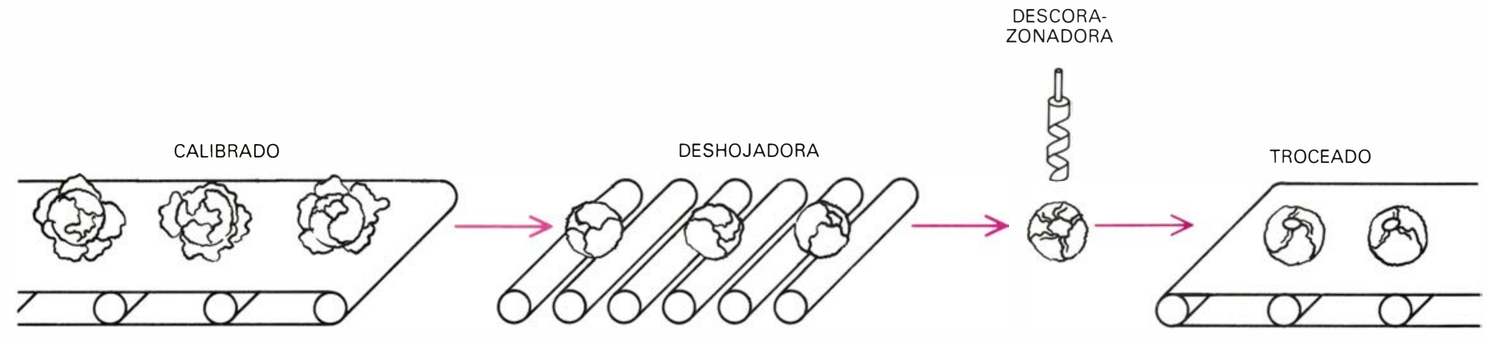
CLASIFICACION DE LOS QUESOS MAS CONOCIDOS. Los quesos blandos se dividen en madurados y no madurados. Un queso madurado es un producto terminado cuando sale de su fermentación inicial. En quesos no madurados se favorece, después del proceso inicial, el crecimiento de levaduras y especies del moho *Penicillium* sobre la superficie del queso. Esta lista es sólo una pequeña muestra de la enorme variedad de quesos que existen.

blo "tempeh" remitirá a la naturaleza del vegetal que ha sido fermentado. Por ejemplo, el *tempeh kedele* se prepara con *kedele*, nombre que en Indonesia recibe la soja. *Tempeh bongkreg katjang* se hace de cacahuetes, *tempeh enthoe*, de coco, y así sucesivamente.

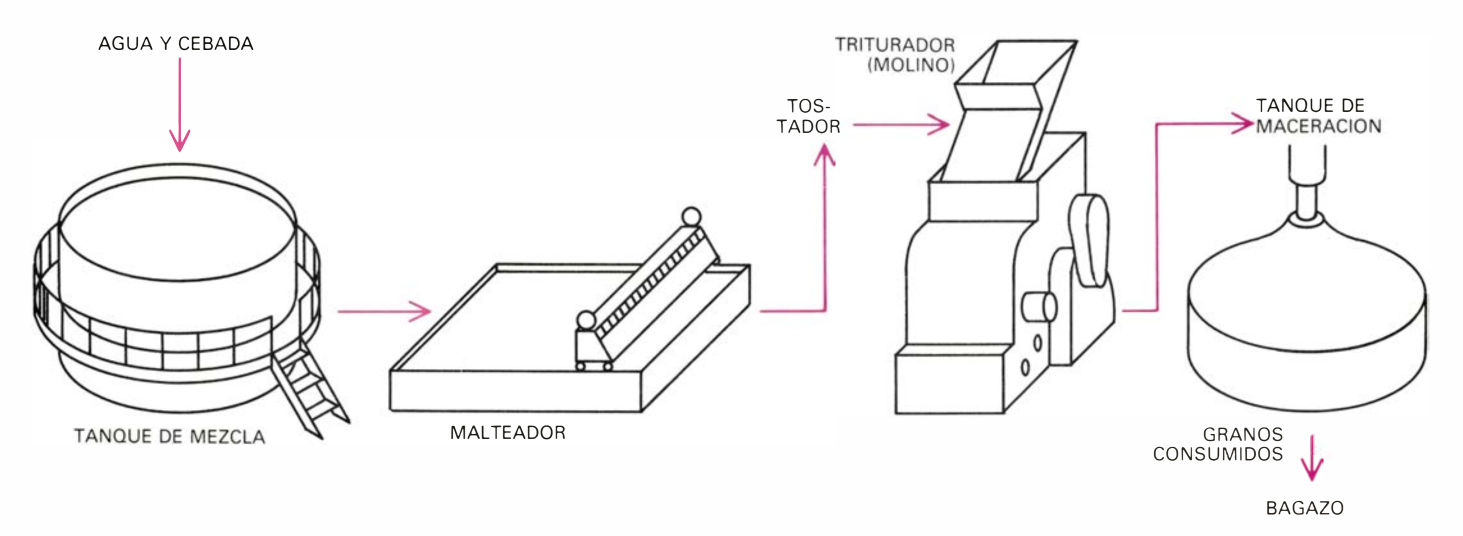
La materia prima vegetal se remoja, se pela, se hierve o escalda y se seca para eliminar el exceso de agua. Se mezcla luego con tempeh de fabricaciones anteriores para suministrar esporas de *Rhizopus*. La masa se coloca en bandejas o entre hojas de banana cuando el tempeh se hace en casa, y se deja hasta que el moho ha penetrado suficientemente. El tempeh no se suele comer crudo, sino que se fríe en aceite de coco o se cocina de alguna otra manera. Contiene un 40 por ciento de proteínas. Se consume ampliamente en Indonesia.



FABRICACION DEL PAN, ilustrada a través de las fases principales de que consta. Una "esponja", o mezcla de cultivos iniciadores, que contiene sólo parte de la harina que se empleará en preparar el pan, se amasa en una mezcladora durante varios minutos; a continuación, se fermenta durante varias horas. Se añade después el resto de la harina y se amasa de nuevo. La divisora corta la masa en piezas pequeñas, a las que posteriormente se les da



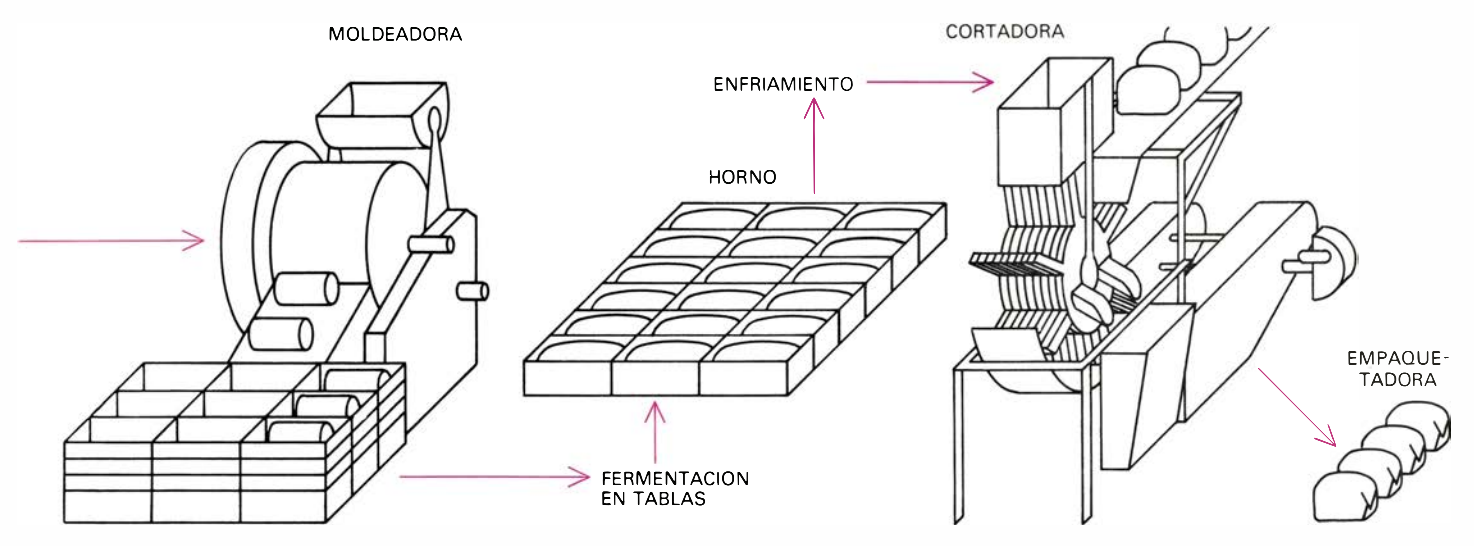
SE PROCEDIO A LA CONSERVACION de los vegetales por fermentación mucho antes de enlatarlos y congelarlos. Se trata de una práctica comercial de amplia difusión incluso en nuestros días. El proceso representado aquí es el utilizado en la conservación de col ácida (Sauerkraut o choucroute) por el



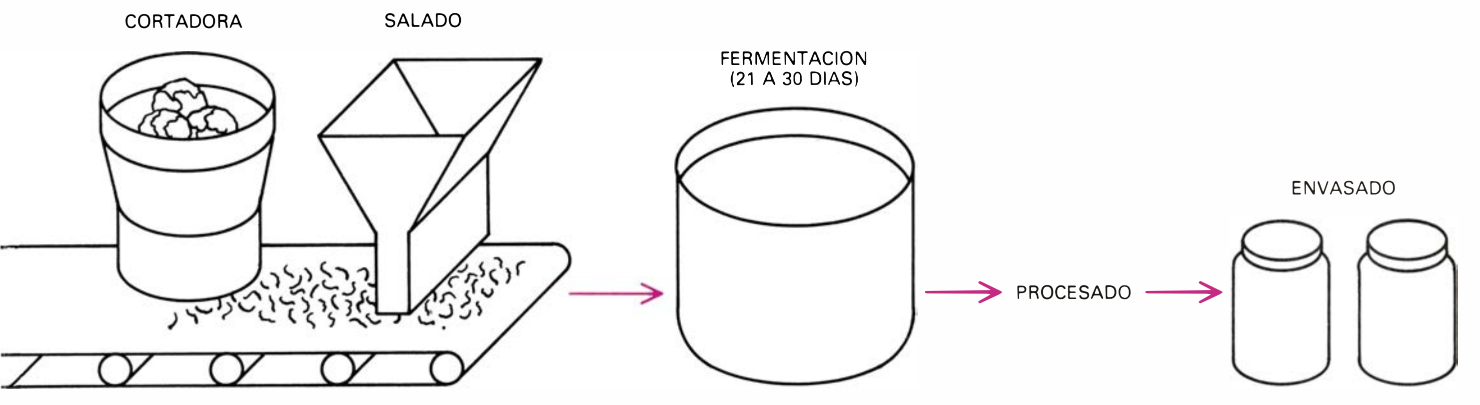
FASES DE LA PRODUCCION DE CERVEZA desde el malteado hasta el embotellado. Se maltea la cebada, a fin de que el grano germine brevemente y produzca enzimas que catalicen la rotura o degradación del almidón. La malta se tritura y mezcla con agua caliente (a menudo también con otros cereales: maíz, por ejemplo); antes de depositarla en los tanques de fermentación, se macera durante unas horas para que los enzimas rompan las largas cadenas

Con ligeras modificaciones en el método empleado para su preparación, encontramos, en otros países, alimentos fermentados autóctonos. Así, en Japón se come el *natto*, nombre que recibe el producto que resulta cuando la soja se fermenta con el moho *Aspergillus oryzae*. Un alimento tradicional chino es el *sufu*, producto de consistencia blanda como el queso, que se fabrica por fermentación de soja cuajada con una variedad de mohos, principalmente especies de *Mucor*. Otra variación sobre el tema es el *ang-kak*, también de origen chino. Se fabrica por fermentación de arroz con el moho *Monascus purpureus*. Aquí, no se trata ya de alterar el sabor del arroz, sino de colorearlo de rojo.

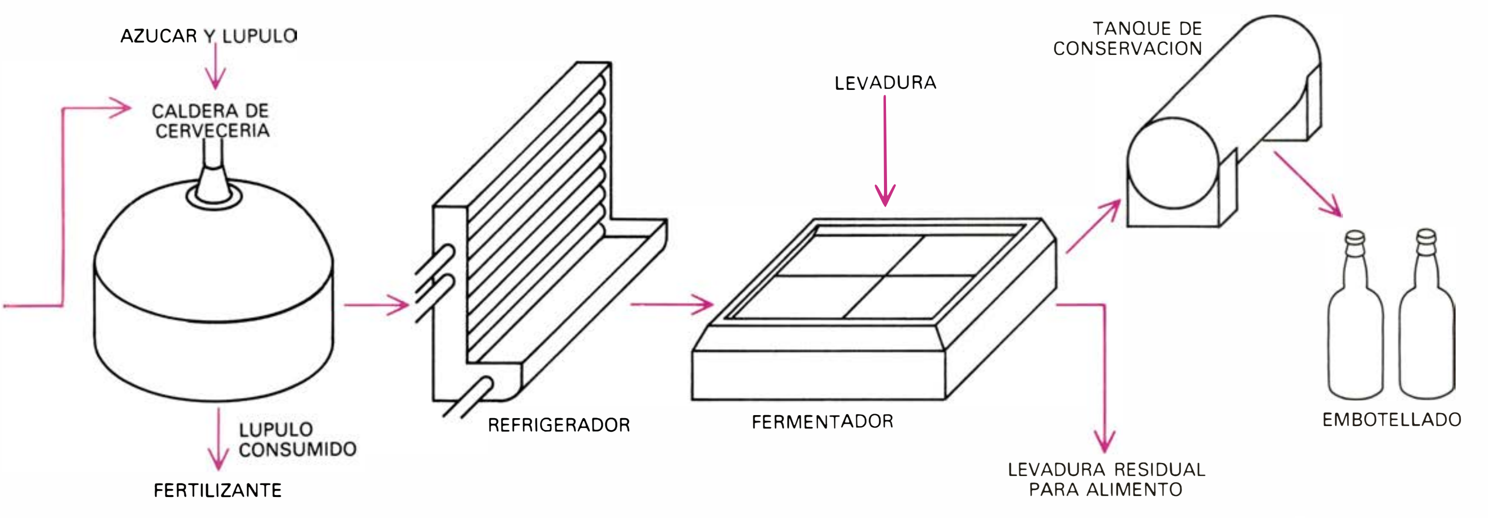
La salsa de soja es un producto muy difundido de la fermentación de la soja.



forma en la boleadora. En este estado la masa es gomosa; se coloca sobre una tabla (no mostrada en el dibujo) donde prosigue la fermentación: la masa se hincha y cambia su estructura, lo que facilita el moldeo. El moldeador da al trozo de masa forma de cilindro, que se coloca en los moldes de cocción. A la hornada le precede una última fase de fermentación. Después de 20 minutos de hornada, las viandas de pan se enfrían, se rebanan y se envuelven.



método de salado en seco. Se genera una salmuera por el gradiente osmótico alcanzado por la interacción de la sal y los fluidos naturales de la col. En la salmuera, las bacterias lácticas que proceden de la col fresca llegan a predominar sobre la flora restante a lo largo de todo el proceso de fermentación.

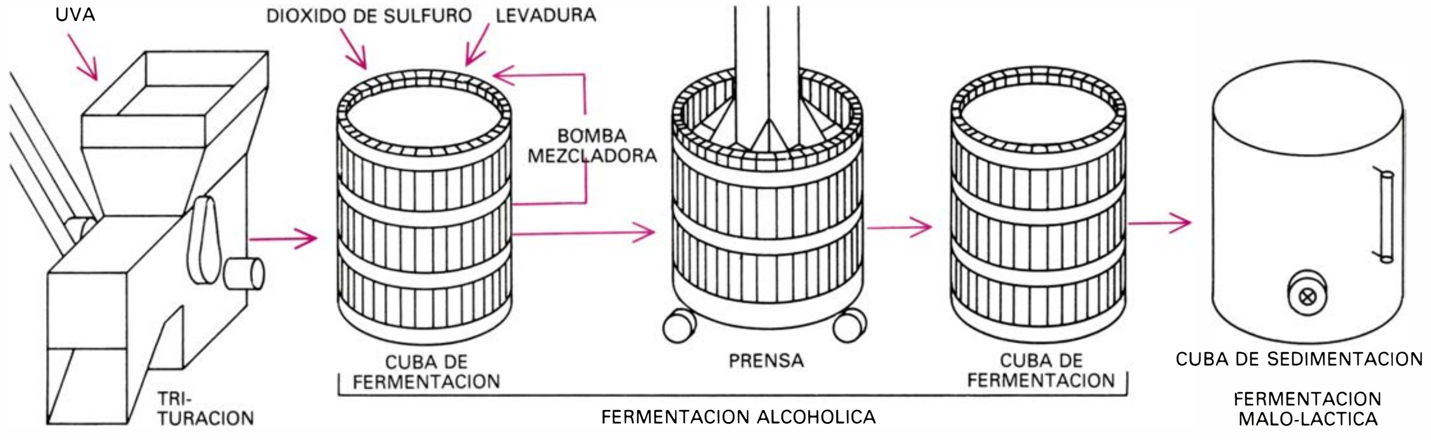


de almidón en hidratos de carbono de moléculas más pequeñas. El extracto acuoso, llamado mosto, se separa de la mezcla y se cuece con lúpulo en una caldera para conferirle su sabor típico a la cerveza. Se elimina el lúpulo. Se pone a fermentar el mosto en recipientes, donde se siembra con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Después de la fermentación, la cerveza puede ir a un tanque para madurar y, posteriormente, se pasteuriza y embotella.

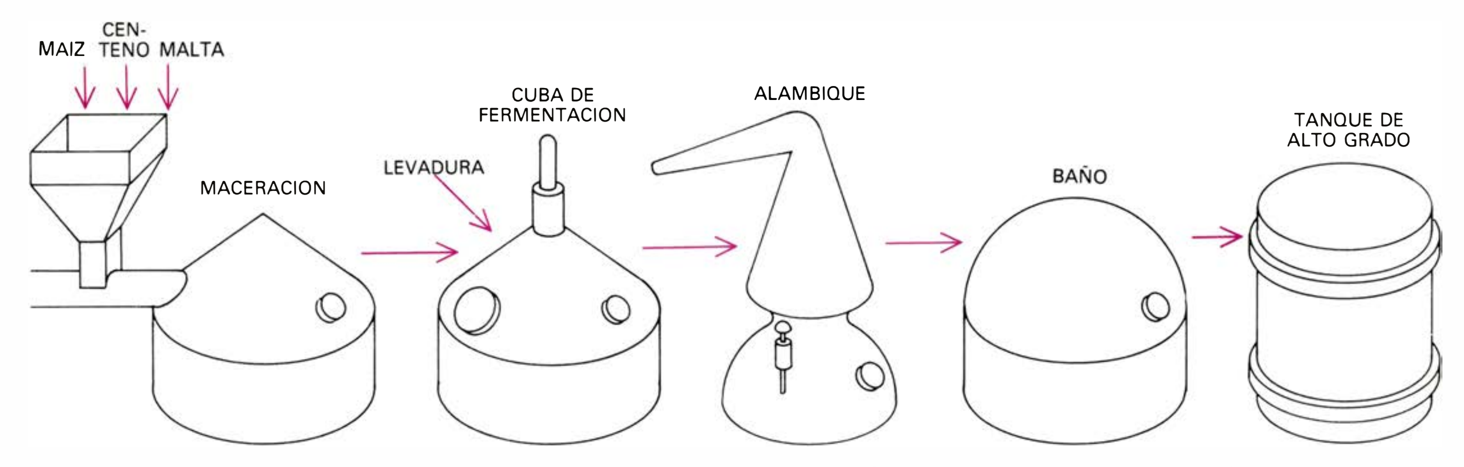
Elaborado desde hace muchos siglos en China, se introdujo más tarde en otros países orientales, particularmente en Japón, convertido hoy en su principal productor. Se obtiene fermentando una mezcla salada de soja y trigo con el moho *A. oryzae*. La mezcla, llamada *koji*, se coloca en un recipiente con una cantidad igual de una solución de sal, de lo que resulta una masa conocida como *moromi*. El *moromi* se fermenta de ocho a 12 meses en grandes tanques, con algo de agitación, y preferiblemente a baja temperatura. Los microorganismos responsables de la fermentación (la bacteria *Pediococcus soyae*, la levadura *Saccharomyces rouxii* y especies de levaduras del género *Torulopsis*) aparecen en el *moromi*. A veces se añaden cultivos iniciadores de estos microorganismos al *moromi*, pero, en uno u otro proceso, el metabolismo de los microorganismos enriquece el producto con ácido láctico, otros ácidos y con etanol. Cuando finaliza la fermentación, se prensa el *moromi* y se envasa la salsa extraída. El residuo prensado sirve de pienso para los animales.

El descubrimiento de la harina y, por tanto, de la fabricación del pan, parece datar de los primeros estadios de la civilización humana. Quizá debiéramos emplazar su lugar de origen en Egipto. Los primeros panes no se fermentaban; se obtenían amasando una mezcla de harina y agua. No sabemos cuándo se fermentó la masa por primera vez. El principal efecto de la fermentación panaria es el aumento de volumen de la masa, resultado de la ruptura de azúcares por las levaduras y de la formación de burbujas de dióxido de carbono. Las burbujas quedan atrapadas en la masa y, cuando se cuece al horno, dan al pan fermentado su característica textura, que recuerda al panal. La fermentación panaria puede producirse en virtud del crecimiento espontáneo de la levadura en la mezcla de harina y agua, o bien de la adición, a la masa, de cerveza en fermentación.

Hoy, la fabricación del pan y el cultivo a gran escala de las levaduras de panificación constituyen una de las ramas más refinadas de la microbiología industrial. Aunque los panes no fermentados, ázimos, se fabrican aún en muchas partes del mundo, en el pan que se consume en los países desarrollados se mezcla harina (generalmente harina de trigo) con agua y una pequeña proporción de levadura, sal, azúcar y grasa. Después de amasar la mezcla, se deja fermentar la masa a una temperatura de 25 grados Celsius (más alta en procesos recientes). La levadura, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, degrada los azúcares de la masa originando una mezcla de alcohol y dióxido de carbono, gas cuyas burbujas quedan retenidas en la masa. Esto es la fermentación. Cuando la masa se hornea, después del período de fermentación, se elimina el alcohol; en cambio, las burbujas de dióxido de carbono permanecen y dan textura al pan. Algunos azúcares, incluidos los que se han agregado como sacarosa o de azúcar de caña, los utilizan las levaduras inmediatamente. Hay que sumar esos glúcidos a los que proceden del almidón del grano de cereal, que son liberados por dos enzimas, la alfa-amilasa y la beta-amilasa, constituyentes de la harina, que el agua los activa. Entre esos azúcares se reconocen la maltosa y la glucosa. La mal-



LA FABRICACION DEL VINO, tal como aquí se representa, es un proceso generalizado. La realidad es un tanto distinta según se trate de vino tinto o vino blanco. En la ilustración figura una producción en cuba. Algunos tipos de poco valor se manufacturan por un proceso de fermentación continua. El



LOS DESTILADOS, piénsese en el whisky, se fabrican por un proceso muy parecido al de la fermentación de la cerveza. El que se representa aquí corresponde a la elaboración de bourbon, aguardiente de maíz. Los granos de maíz se mezclan con pequeñas cantidades de centeno y cebada malteada, se trituran y mezclan con agua caliente. El extracto que sale de la masa del tanque se lleva a un fermentador y se inocula con levadura. Concluida la fermentación,

tosa suele ser degradada por las levaduras hacia el final del proceso de fermentación, consumidos ya, o casi, los demás azúcares.

Que la función principal de las levaduras en la fermentación panaria sea dilatar la masa, no excluye otros ámbitos de acción. Así, cambian la estructura y textura de la masa, mediante la modificación de la estructura del gluten, la proteína principal del trigo, durante el tratamiento mecánico de la masa. Al excretar compuestos como cisteína y glutatión, las levaduras alteran la estructura del gluten rompiendo enlaces disulfuro (S-S) intramoleculares. Los productos de la fermentación originados por la levadura modifican también el sabor de la masa cocida y aumentan, hasta cierto punto, su valor nutritivo.

A lo largo de los últimos 25 años, este método de fabricar pan, a menudo llamado proceso de fermentación en masa, ha sufrido cambios que han permitido un mayor rendimiento en la manipulación rápida de la masa por máquinas. El método rápido se propone producir masa panaria a un ritmo más célere que la fermentación en masa; de ahí que la fermentación se efectúe a una temperatura más alta (normalmente alrededor de los 35 grados Celsius). La masa contiene entonces una proporción mayor de levadura, o una cepa de este organismo dotada de mayor actividad fermentativa. La masa se somete, además, a un intenso mezclado mecánico, que afecta a la estructura de la misma.

La industria moderna de fabricación del pan carecería de consistencia si no fuera asociada con la industria productora de levaduras de panadería. Hasta mediados del siglo XIX, las levaduras que se añadían a la masa de pan eran levaduras residuales de la fermentación de la cerveza. Mas, a medida que el volumen de panificación iba en aumento, quedaba rezagándose la levadura residual, incapaz ya de asegurar un rendimiento suficiente. Así nacieron las fábricas productoras de levadura de panadería. Se desarrollaban en ellas cepas especialmente seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se las cultiva en condiciones de elevada aireación en un medio nutritivo basado en las melazas. La producción a gran escala de levadura de pan debe realizarse bajo condiciones rigurosamente controladas, para asegurar la constante capacidad de fermentación de pan que las tahonas necesitan todos los días.

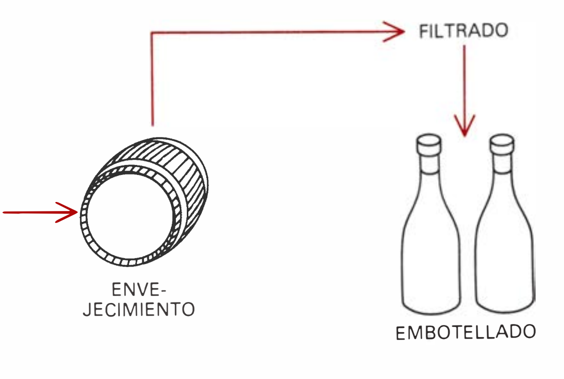
El fabricante de bebidas alcohólicas explota también la fermentación de azúcares por *S. cerevisiae*. El requisito esencial es ahora el alcohol, no el dióxido de carbono. Las bebidas alcohólicas se agrupan en tres categorías: los vinos y cervezas, que se fabrican por fermentación con levaduras de un zumo de fruta o de un extracto azucarado de un grano; los vinos encabezados, en los que se añade brandy al vino, y los destilados, que se obtienen por destilación de vinos o cervezas.

Cualquier solución de sustancias azucaradas de granos que se deje en reposo sufrirá pronto la infección de microorganismos. La arqueología nos demuestra que la fermentación de extractos de granos constituía ya una técnica avanzada hace más de 6000 años. Las cervezas que se elaboraban no sólo sabían mejor que el agua, sino que eran bebidas más seguras, pues, debido a su acidez y al contenido de compuestos antimicrobianos derivados del lúpulo, los organismos patógenos no pueden desarrollarse en la cerveza. La producción mundial de cerveza ronda hoy los 700 millones de hectolitros por año. El consumo "per capita" más alto se da en Alemania Occidental y en Australia.

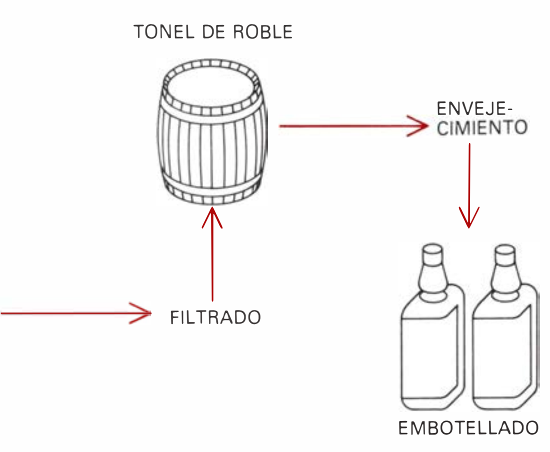
La mayor parte de la cerveza se saca de la cebada, aunque también se fabrican pequeñas cantidades a partir de otros cereales. Se empieza por maltear el grano de cebada, lo que significa que hay que dejarlo germinar un corto tiempo. El motivo principal de esa operación es producir enzimas en el grano que (durante el malteado, o más tarde) catalicen la rotura del almidón. La cebada malteada se tritura y se mezcla con agua a una temperatura de hasta 67 grados Celsius. En pocas horas, los enzimas de la masa degradan las largas cadenas de almidón en moléculas de hidratos de carbono, más pequeñas, y rompen también otras moléculas de cadena larga, como las proteínas.

El extracto acuoso, el mosto, se separa del residuo del grano y se cuece, tradicionalmente con lúpulo, para conferirle su sabor típico a la cerveza. La cocción del mosto no sólo extrae compuestos aromáticos del lúpulo, sino que también detiene la acción enzimática y precipita sus proteínas. Ahora, el mosto lupulado se siembra con una raza de *S. cerevisiae*. La función principal de las levaduras estriba en convertir los azúcares del mosto en alcohol y dióxido de carbono. (Durante la fermentación, la cantidad de levadura se multiplica por cinco.) Otros productos del metabolismo de las levaduras, cuantitativamente menores, condicionan, de un modo decisivo, el sabor final de la cerveza. Entre ellos recordaremos alcoholes de mayor peso molecular, como el amílico, isoamílico y el feniletílico, presentes en la cerveza a concentraciones del orden de miligramos por litro. Otros compuestos importantes en el sabor, formados por las levaduras, son los ácidos de cadena corta, como el acético y butírico, y los ésteres de ambos. Tras la fermentación, la levadura se separa de la cerveza, que se deja madurar el tiempo apropiado. Después de la filtración, pasteurización y, posiblemente, otros pasos, la cerveza está lista para su envasado y venta.

Se han venido empleando tradicionalmente dos tipos de levaduras en la industria cervecera. La mayoría de las cervezas son de tipo lager fabricadas con una levadura que se instala en el fondo de los tanques durante la fermentación. Estas levaduras de fermentación baja fueron aisladas en cultivo puro por primera vez, hace unos 100 años, por el botánico danés Emil Christian Hansen, a la sazón en el Instituto Carlsberg de Copenhague. (De ahí su nombre: *Saccharomyces carlsbergensis*.) En Gran Bretaña y en diversas zonas de Europa y América del Norte, la levadura empleada en la fabricación de



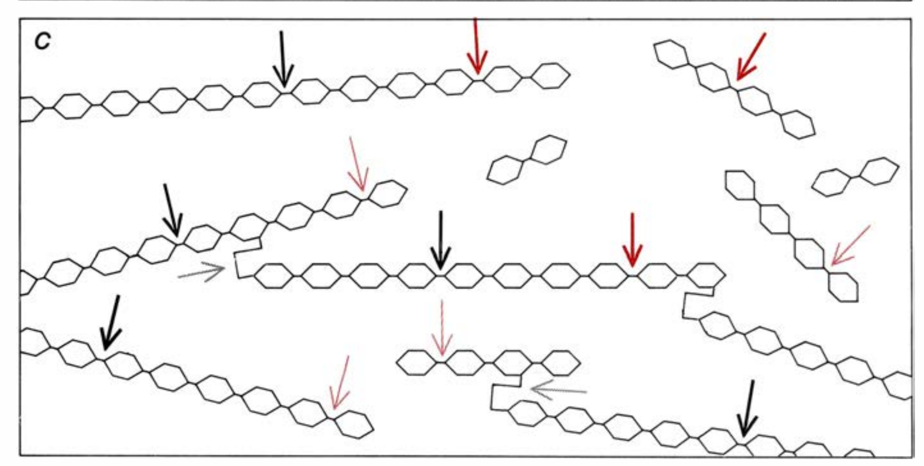
zumo de uva alimenta de un modo constante el fermentador y el vino se extrae inintermitentemente.

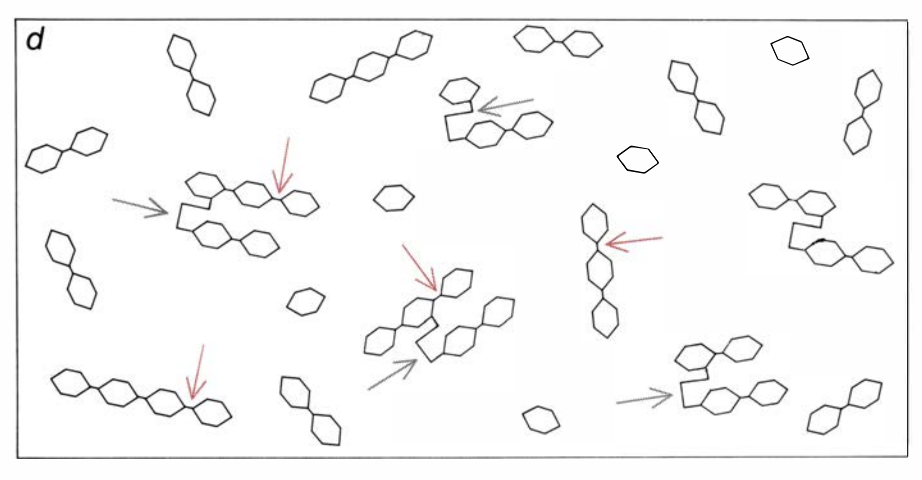


el líquido se trasvasa a una unidad de destilación o alambique. El destilado condensado se recoge en tanques y se deja madurar varios años en toneles.

a

OH
O
OH
HO
OH
OH





d

DEGRADACION DEL ALMIDON en la fermentación de la cerveza. Los enlaces se rompen por la acción de los enzimas de la malta, la alfa-amilasa (*flechas negras*) y la beta-amilasa (*flechas de color oscuro*) sobre largas cadenas de glucosa, cuya molécula se muestra en *a*. Las cadenas rectas (*b*) representan uno de los componentes del almidón, la amilosa, y las estructuras ramificadas, el otro componente, la amilopectina. La beta-amilasa separa dos unidades de glucosa a la vez (*c*) produciendo maltosa, un disacárido. Al mismo tiempo, la alfa-amilasa actúa en puntos más internos de la cadena, separando grandes secciones sobre las que actuará la beta-amilasa. Los productos de la acción de las dos amilasas aparecen en *d*. También se muestra (*c, d*) el punto de acción de los dos enzimas que actúan sobre la dextrina. Un enzima desramificante (*flechas grises*) rompe los enlaces en los puntos de ramificación; la amiloglucosidasa (*flechas de color claro*) separa restos sencillos de glucosa de las dextrinas. La manipulación genética de las células ha mejorado su capacidad para fermentar dextrinas. Consumen así más hidratos de carbono en la fermentación y dan cerveza más "ligera", que se distingue por su bajo contenido de carbohidratos.

la cerveza sube hasta la superficie durante la fermentación. Las levaduras de fermentación alta son clasificadas como cepas de *S. cerevisiae*. Para los taxónomos no constituyen dos especies distintas, aunque se sigue usando una y otra denominación entre los fabricantes. Las cepas de levaduras corrientes en cervecería se han ido seleccionando empíricamente a lo largo de siglos de explotación. ¿Qué se hace hoy? La meta está fijada en acomodar la composición genética de esos microorganismos a las necesidades particulares de cada maestro cervecero.

La tecnología de la fabricación del vino es mucho más simple. Hasta anteayer, como el que dice, el proceso apenas difería de la práctica habitual ya 5000 años atrás. La uva blanca o negra de variedades seleccionadas para vino se vendimia y se prensa para exprimir el zumo, o mosto. Hasta hace poco, se dejaba que los microorganismos presentes en la superficie de las uvas frescas fermentaran el mosto a su aire. La flora natural de la piel de la uva comprende diversas levaduras, algunas de géneros distintos del *Saccharomyces*. A muchas de estas levaduras, responsables de la primera parte de la fermentación, las mata el alcohol producido por las cepas de *S. cerevisiae* en la fermentación del mosto. Terminada la fermentación, se filtra y embotella el vino.

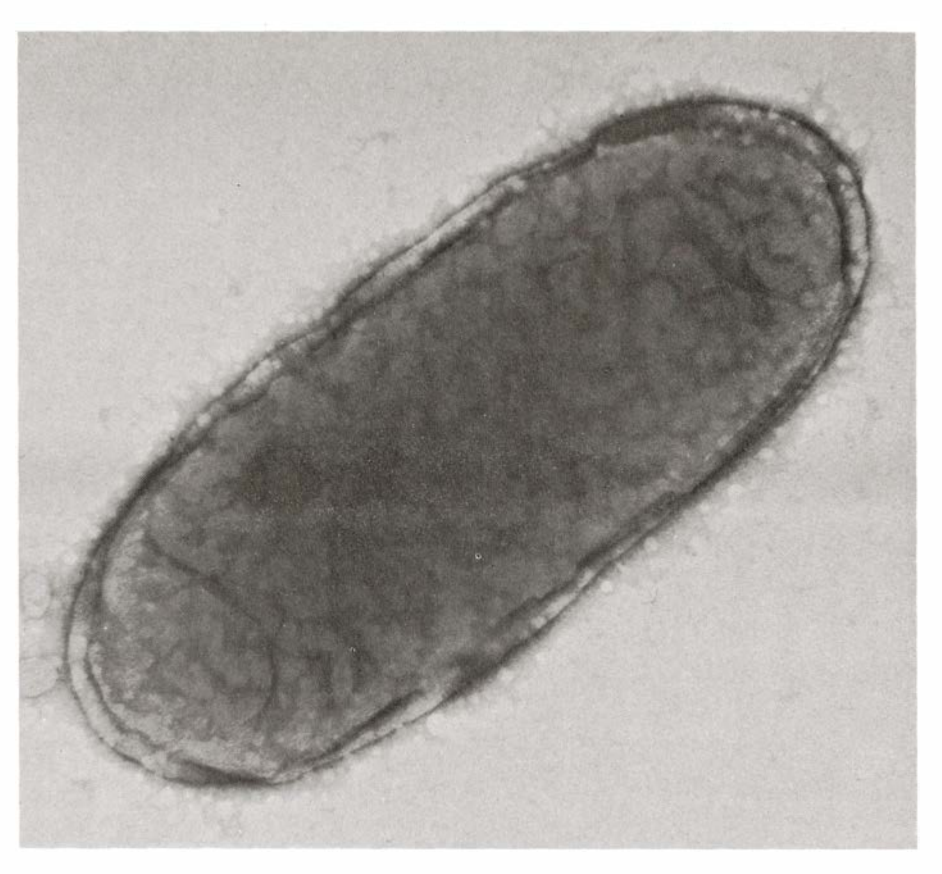
En los últimos años, hemos asistido a un cambio en la microbiología de la fabricación del vino. Muchos industriales no dejan ya la fermentación a la acción espontánea de las levaduras de la piel de la uva, sino que añaden al mosto cultivos especiales, seleccionados, de *S. cerevisiae*. También se regula la temperatura de fermentación, cuyo óptimo se encuentra entre los siete y los 14 grados Celsius. En algunas zonas, el vino no se fermenta en lagares, sino por el procedimiento de fermentación continua. El mosto alimenta sin cesar el proceso de fermentación y se va extrayendo vino sin parar. Hemos de puntualizar que sólo los tipos más baratos se fabrican según el proceso de fermentación continua.

La industria emplea métodos similares para extraer vino de otros zumos de frutas. La fabricación del sake, o vino de arroz, se acerca más, empero, a la fabricación de cerveza, por la sencilla razón de que el arroz contiene más almidón que azúcares. El almidón, para ser fermentado, ha de convertirlo en azúcares fermentables el moho *Aspergillus oryzae*. Las esporas del moho se mezclan con arroz cocido al vapor;

mezcla que se incuba durante cinco o seis días a una temperatura próxima a los 35 grados C para producir el *koji*. Las porciones de *koji* vuelven a combinarse con más arroz cocido y levadura de sake, una cepa de *S. cerevisiae*. Este cultivo iniciador, llamado *moto*, sirve para fermentar el arroz cocido (*moromi*) durante unas tres semanas. El sake contiene hasta un 20 por ciento de alcohol en volumen.

La adición de brandy al vino para fortalecerlo se efectuaba al principio para detener el proceso de fermentación y hacer biológicamente estable al vino. Los tipos fortificados, o encabezados, llevan un 15 o 20 por ciento de alcohol por volumen; no son susceptibles, pues, de contaminación microbiana. Excepto en el jerez fino y amontillado, la simple fortificación implica agregarle al vino una cantidad apropiada de brandy, almacenarlo breve tiempo y un ajuste final del contenido de alcohol, nuevamente con brandy. En la producción española del vino de jerez fino y amontillado, una vez encabezado, se deja que madure en contacto con el aire para favorecer así el crecimiento de una flora superficial formada por varias levaduras. La actividad metabólica de estas levaduras contribuye al aroma característico de los vinos jerezanos.

La fabricación de destilados de origen cereal difieren de la producción cervecera (amén de en el proceso de destilación, lógicamente) por la no cocción del grano. Así pues, los enzimas activos en el mosto continúan operando a lo largo de la fermentación, degradando más azúcar y produciendo más alcohol. Los destilados difieren unos de otros en virtud del proceso de destilación. El whisky de malta escocés se destila en pequeños alambiques, mientras que la mayoría de los demás whiskys lo hacen en plantas de operación continua. En muchos destilados, el líquido fermentado se transfiere al alambique junto con las levaduras, ya que se ha demostrado que las levaduras pueden contribuir a mejorar el aroma y sabor de la bebida final. Contribuyen en el aroma y sabor del producto final los compuestos extraídos por el líquido de la madera de los barriles donde envejecen estos destilados, whiskys y brandys.



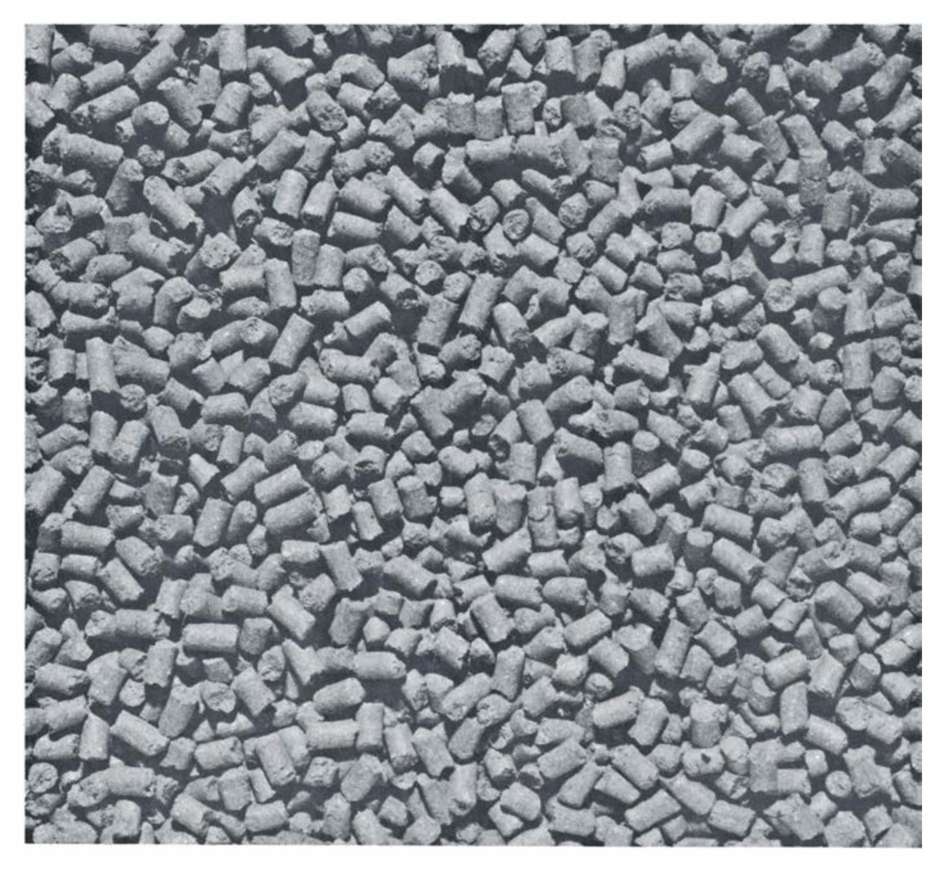
UN ALIMENTO Y PIENSO MICROBIANO, de nombre comercial Pruteen, se obtiene por cultivo en gran escala de la bacteria *Methylophilus methylotrophus*. Lo fabrica la Imperial Chemical Industries, de Gran Bretaña. La micrografía, en la que aparece una sola célula, está ampliada unos 78.000 diámetros.

Expliqué más arriba cómo una de las principales ventajas que comportaba el crecimiento microbiano en alimentos tipo tempeh era la de aumentar el contenido proteico. Extensión lógica de esta idea es el desarrollo, a gran escala, de microorganismos apropiados, como fuente directa de alimentos para el hombre y de piensos para animales. Lo que se acometió, por primera vez, en Alemania, durante la primera guerra mundial, habida cuenta de la escasez de víveres. En Berlín, Max Delbrück (no el que fuera famoso biólogo molecular) y sus colegas desarrollaron un proceso para obtener levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) a gran escala. Tal producción logró reemplazar un 60 por ciento de los alimentos que Alemania importaba antes del conflicto. La levadura se añadía, principalmente, a sopas y embutidos.

Las levaduras aprovechadas en la alimentación volvieron a desempeñar un papel importante en la dieta de los alemanes a lo largo de la segunda guerra mundial. Varias fábricas se aprestaron a desarrollar cepas especiales de levaduras (*Candida arborea* y *C. utilis*) para cubrir necesidades alimentarias. Más tarde, en la década de los 60, esa estrategia ocupa un primer plano a la hora de idear recursos de ayuda para los países subdesarrollados. Algunas de las grandes compañías petrolíferas diseñaron procesos para desarrollar cepas de *Candida lipolytica*, que obtenían el carbono y la energía para el crecimiento de los alcanos (moléculas de hidrocarburos de cadena lineal) del petróleo. La *C. lipolytica* se asemeja a la levadura alimenticia *C. utilis* y, además, presenta la ventaja de poder crecer sobre alcanos.

Fue por entonces cuando se acuñó el término proteínas unicelulares para describir el nuevo campo de alimentos y piensos microbianos. Entre los trabajos pioneros, sobresalió el de la British Petroleum Company. Bautizaron el producto con el nombre de Toprina y el proceso alcanzó tal desarrollo que se levantó una planta de 100 millones de dólares en Cerdeña. Desgraciadamente, la planta nunca aportaría la contribución que de ella se esperaba para paliar la escasez alimentaria. Y en ello tiene que ver el encarecimiento del petróleo, que ha obligado a otras muchas compañías a cambiar sus planes económicos sobre las proteínas unicelulares; hubo problemas políticos, y la compañía no logró convencer a las autoridades italianas de la inocuidad absoluta de la Tropina. La planta sigue parada.

Ello no obstante, hay dos empresas al menos que permanecen interesadas en el proyecto de las proteínas unicelulares a partir de metano como sustrato: Hoechst AG, de Alemania Federal, e Imperial Chemical Industries, de Inglaterra. La británica acaba de iniciar la producción de la bacteria *Methylophilus methylotrophus* en una fábrica ca-



MUESTRA DE PRUTEEN en forma de comprimidos; este alimento y pienso de proteínas unicelulares, de color marrón claro, se presenta, también, en forma granular. El producto se fabrica por crecimiento masivo de la bacteria *M. methylotrophus*, capaz de utilizar metano como fuente de energía y carbono. En el proceso industrial, el metano se transforma previamente en metanol, del que se abastecen las bacterias.

paz de sacar 75.000 toneladas anuales. La bacteria puede oxidar metano. Mas, para evitar problemas de seguridad que podrían derivarse de la mezcla del metano con el aire, aquél se transforma químicamente en metanol, que sirve como fuente de carbono y energía para la bacteria. El producto se comercializa con el nombre de Pruteen.

El alza y la caída de la aventura de las proteínas unicelulares reflejan el enorme poder de las fuerzas del mercado. El elevado coste del petróleo ha reducido la competitividad de estos productos frente a sus principales rivales en el campo de las proteínas baratas: la soja y la harina de pescado. En la Unión Soviética, donde no operan las fuerzas del mercado, hay 86 fábricas de proteínas unicelulares en funcionamiento; se supone que al menos 12 de ellas cuentan con hidrocarburos como fuente de carbono y energía para el desarrollo de las células.

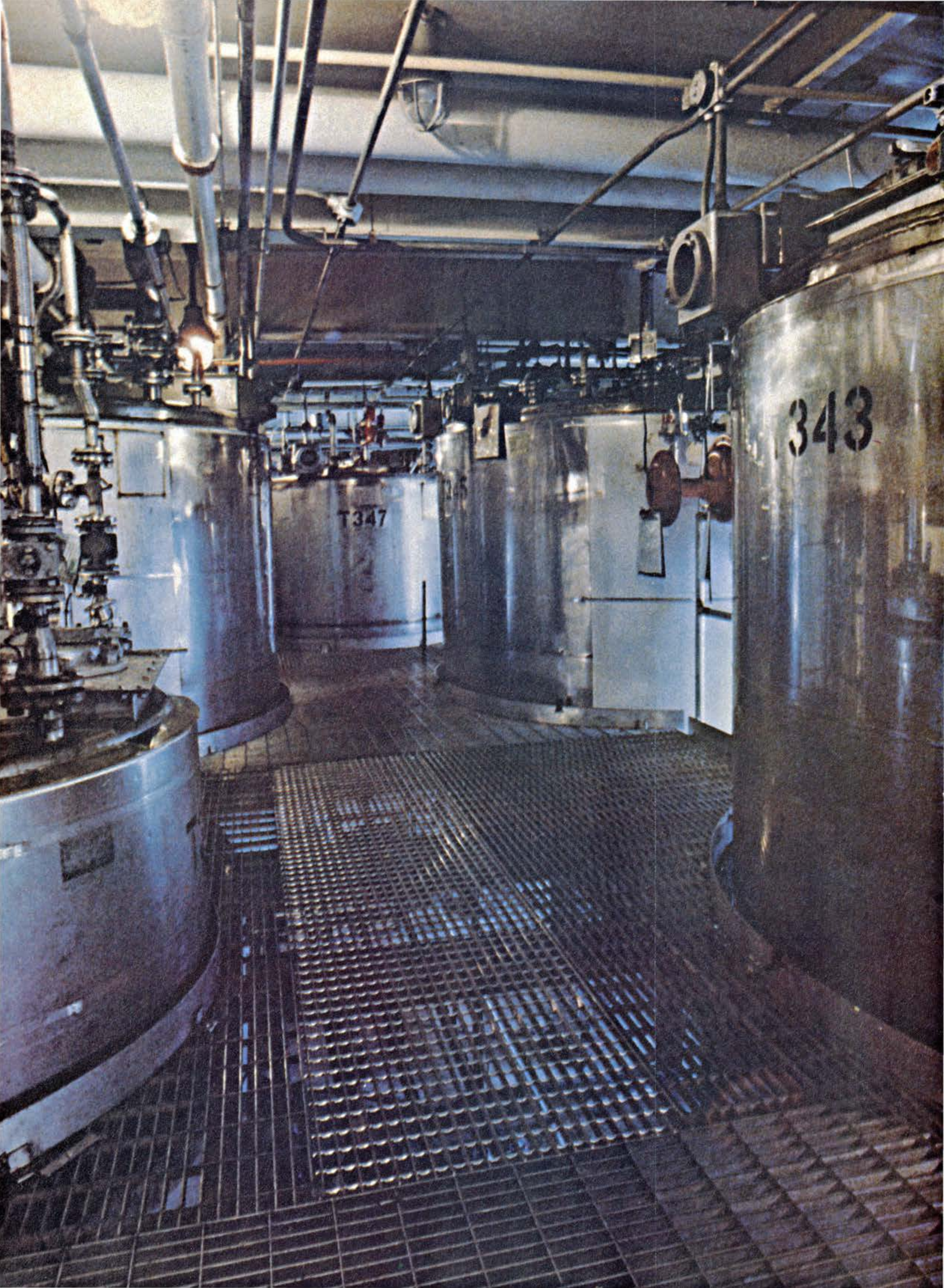
Desde hace cien años, los biólogos del sector alimentario se han venido esforzando por desvelar las múltiples funciones que los microorganismos desempeñan en la fermentación. En algunos casos, así en el tempeh, apenas si saben algo más que los nombres de los organismos que intervienen. En otros, el conocimiento de los cambios ocasionados por la actividad microbiana es mucho más completo. Y es en ellos donde se ha investigado con cepas de microorganismos que pueden llevar a cabo, de un modo más eficiente, los cambios deseados en alimentos y bebidas.

Durante siglos se han seleccionado, por supuesto de forma empírica, cepas mejoradas, pero los conocimientos modernos le permiten al microbiólogo de alimentos buscar razas que produzcan, por ejemplo, ciertos compuestos aromáticos en mayor o menor concentración. Hasta hace poco, las técnicas, bastante refinadas, de selección y mejora de razas podían aplicarse sólo a los microorganismos asequibles al análisis genético. Así, podría inducirse que algunas de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la fermentación de alimentos o bebidas formaran esporas sexuales; se aseguró el éxito de programas de selección de cepas que se fundaban en la hibridación. Tales programas, necesariamente empíricos, han contribuido de una manera muy valiosa en la mejora de razas de levaduras empleadas en panadería.

Recientemente, la industria cervecera ha puesto en práctica nuevas técnicas de manipulación genética de *S. cerevisiae*. Entre otros objetivos marcados, se pretende modificar la capacidad de las cepas para fermentar hidratos de carbono. En el caso del mosto de malta, esos glúcidos constan de un 53 por ciento de maltosa, 12 por ciento de glucosa, 13 por ciento de maltotriosa y 22 por ciento de dextrinas y trazas de maltotetraosa. Las razas de levadura de cervecería que operan arriba o abajo son capaces de fermentar todos esos hidratos de carbono, salvo las dextrinas y, en alguna ocasión, la maltotetraosa. Debido al aumento general de la demanda de cervezas ligeras, lo que significa cerveza con un bajo contenido en hidratos de carbono, se ha intentado introducir en las levaduras de cervecería información genética para fermentar dextrinas, que elevan sustancialmente el contenido de hidratos de carbono del mosto. Afortunadamente, el *Saccharomyces diastaticus*, una especie relacionada con las levaduras de cervecería, fermenta las dextrinas. El objetivo principal que se le ha señalado a la investigación es que logre introducir genes para la fermentación de dextrinas en las cepas de *S. cerevisiae* de uso común en la industria cervecera.

Algunas compañías del sector han conseguido ya insertar genes que degradan dextrinas en sus propias cepas de levaduras. Pero, hasta la fecha, ninguna de las razas obtenidas por ingeniería genética se ha aplicado a la fabricación de cerveza. No hay en ello misterio alguno: cuando los genes del *S. diastaticus* se introducen en las levaduras de cerveza, las razas recpetoras producen cerveza con un desagradable sabor fenólico.

Se ha logrado demostrar que el sabor desagradable procede de un compuesto, el 4-vinil-guayacol, que las levaduras fabrican a partir de compuestos derivados del mosto. Se pensó en un principio que los genes formados de 4-vinilguayacol estaban estrechamente ligados a los genes que regulan la degradación de la dextrina, por lo que el mal sabor sería inevitable. Pero los estudios recientes de Roy Tubb y sus colaboradores en la Brewing Research Foundation, de Gran Bretaña, han revelado que los dos grupos de genes no siempre permanecen unidos cuando se manipulan genéticamente las cepas. El camino para la construcción de cepas de levaduras que utilicen dextrinas para fabricar cerveza parece, pues, despejado. Probablemente sea éste el primero de los muchos programas en que los genes se ajusten específicamente para conseguir algún sabor, calidad o técnica de producción deseados en alimentos y bebidas fermentadas.


T347
343

Producción microbiológica de fármacos

Con el descubrimiento de la penicilina comenzó una nueva era en el campo de la medicina. Aparte de un sinfín de antibióticos, los microorganismos suministran ya vitaminas, hormonas humanas, alcaloides, drogas antitumorales e interferón

Yair Aharonowitz y Gerald Cohen

La entrada de la microbiología en la industria farmacéutica, allá por los años cuarenta, trajo consigo una transformación tan profunda de ésta, que bien pudiéramos hablar de auténtica revolución. Los avances registrados en el conocimiento de los microorganismos y en las técnicas de su manipulación genética encuentran hoy su aplicación rutinaria en la identificación de nuevas sustancias terapéuticas, en el trabajo investigador de laboratorio y en los procesos de producción propiamente dichos. Las cadenas de reacciones químicas que constituyen el sistema metabólico de un microorganismo representan los medios de producción. Sumergidas en un medio líquido enriquecido, se cultivan células genéticamente idénticas, mantenidas en grandes tanques. Allí se reproducen y rinden. Se extraen luego aquellos productos metabólicos que encierran interés farmacéutico para su posterior purificación.

Esos inmensos cultivos celulares los explotará la industria farmacéutica de tres maneras, que se distinguen por la cantidad de información necesaria para elaborar el producto que se halle en el genoma inalterado del organismo. Por genoma se entiende la dotación entera de genes. Pensemos en el caso de los antibióticos. Aquí el producto es un metabolito natural y la célula posee toda la información que requiere su síntesis. (A pesar de lo cual, el producto suele modificarse luego por vía química.) A un metabolito natural del hongo *Penicillium*, la penicilina, se debe justamente el comienzo de la transformación operada en la industria farmacéutica.

Desde una perspectiva comercial y clínica, los antibióticos constituyen la clase más importante de fármacos que se obtiene de los microorganismos. Se han adaptado las técnicas biológicas a la producción de sustancias que no eran metabolitos naturales de los microorganismos. Tal es el caso de la elaboración de hormonas esteroideas. Dentro de la larga secuencia que comprende su proceso de síntesis, los microorganismos participan en ciertas fases, denominadas bioconversiones; los pasos restantes se acometen por métodos no biológicos. Por tanto, sólo la información necesaria para las contadas intervenciones de los microorganismos se encierra en el genoma de éstos.

En la tercera forma de utilización de los cultivos celulares que muestra la industria farmacéutica, el genoma del organismo no contiene, de partida, información alguna para definir la estructura de la molécula producto. Hay que insertar la información en la célula. Y así es como células bacterianas o fúngicas llegan a producir proteínas humanas. De este recurso se echa mano hoy para elaborar fármacos tan importantes desde el punto de vista clínico como la insulina. Aunque se trata de una tecnología recentísima y novedosa en la industria farmacéutica, se está abriendo paso en un área donde los métodos microbiológicos han creado ya un emporio comercial. Las cifras son reveladoras. En 1979, el valor total de las drogas recetadas que se vendieron en los Estados Unidos ascendió a 7500 millones de dólares, de los cuales el 20 por ciento –la nada despreciable cantidad de 1500 millones– correspondió a drogas en cuyo proceso de fabricación los microorganismos desempeñaron un papel preponderante.

La clase más abundante de fármacos está integrada por aquellos para los cuales toda la información genética requerida, o su fracción más destacada, se encuentra en el genoma intacto de la célula. Y la fracción más importante de esa clase, desde el punto de vista económico, la representan los antibióticos. Si bien deben incluirse también antígenos virales y bacterianos, agentes antifúngicos, ciertas drogas antitumorales, alcaloides y vitaminas. Las ventas correspondientes al ejercicio de 1978 de los cuatro grupos principales del sector de los antibióticos –penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y eritromicina– ascendieron a 4200 millones de dólares. (Se dan las ventas de 1978 por ser este el año más reciente del que se dispone información completa de todo el mercado internacional. Se trata, empero, de un valor ajustado a los precios de 1980 para compensar los efectos de la inflación.) También ofrece un elevado interés comercial, dentro de los antibióticos, el grupo de los aminoglucósidos, donde se inscribe la estreptomicina. En el panel de ventas, tras los antibióticos vienen las vitaminas, que comercializaron un volumen de ventas de 670 millones de dólares, en el año 1978 (cifras asimismo ajustadas a los precios vigentes en 1980).

El proceso industrial en que se basa esa actividad comercial es la fermenta-

EN LA ELABORACION DE LAS PENICILINAS se combinan pasos químicos con fases biológicas; se muestran aquí los cristalizadores, donde transcurre uno de los procesos clave de la producción. La elaboración empieza en los tanques de fermentación, recipientes cuya capacidad puede llegar hasta 100.000 litros. En esos depósitos se cultiva una cepa industrial del hongo *Penicillium chrysogenum*, en un medio líquido muy rico. La penicilina *G*, una de las formas de la penicilina, es metabolito natural de las células fúngicas. En esta planta, explotada por la Pfizer, Inc., en Groton, Connecticut, hay 15 tanques, cuya producción se solapa, de forma que la elaboración del antibiótico sea continua. Terminada la fermentación, que dura varios días, se separa la penicilina *G* de las células fúngicas y se traspasa a los cristalizadores, donde se añade butanol. Este se evapora, arrastrando consigo agua y dejando en el cristalizador una pasta cristalina de penicilina *G* de más del 99 por ciento de pureza. Modificaciones químicas posteriores, a partir del núcleo que configura el anillo beta-lactámico, dan lugar a las otras formas de penicilina.

CATEGORIA DE LA DROGA	PRINCIPALES PRODUCTORES EN EE.UU.	VALOR DE MERCADO
PENICILINAS	Ayerst Laboratories Lederle Laboratories Eli Lilly and Company Smith, Kline & French Laboratories E. R. Squibb & Sons, Inc. Warner-Lambert Company Wyeth Laboratories	$220,943,000
OTROS ANTIBIOTICOS DE AMPLIO Y MEDIO ESPECTRO	Abbott Laboratories Bristol Laboratories Lederle Laboratories Eli Lilly and Company Merck Sharp & Dohme Schering-Plough Corporation E. R. Squibb & Sons, Inc. The Upjohn Company Warner-Lambert Company Wyeth Laboratories	$638,297,000
ANTIBIOTICOS EN COMBINACION CON SULFONAMIDAS	Bristol Laboratories Burroughs Wellcome Co. Ross Laboratories	$16,921,000
ANTIBIOTICOS DE ACCION TOPICA	Lederle Laboratories Eli Lilly and Company Marion Laboratories, Inc. Schering-Plough Corporation The Upjohn Company Warner-Lambert Company	$17,064,000
VACUNAS	Lederle Laboratories Merck Sharp & Dohme Warner-Lambert Company Wyeth Laboratories	$90,000,000
SULFONAMIDAS	Alcon Laboratories, Inc. Lederle Laboratories Hoffmann–La Roche, Inc. Smith, Kline & French Laboratories E. R. Squibb & Sons, Inc. Warner-Lambert Company	$47,562,000
DROGAS ANTIFUNGICAS	Ayerst Laboratories Barnes-Hind Pharmaceuticals, Inc. Ciba-Geigy Corporation Lederle Laboratories Ortho Pharmaceutical Corporation Hoffmann–La Roche, Inc. Schering-Plough Corporation E. R. Squibb & Sons, Inc.	$103,911,000
PREPARACIONES ANTISEPTICAS	Burroughs Wellcome Co. Norwich-Eaton Pharmaceuticals Ortho Pharmaceutical Corporation Sterling Drug Inc. E. R. Squibb & Sons, Inc.	$15,000,000
AGENTES TUBERCULOSTATICOS	Ciba-Geigy Corporation Dow Chemical U.S.A. Lederle Laboratories E. R. Squibb & Sons, Inc. Warner-Lambert Company	$12,835,000
ENZIMAS DIGESTIVOS	Armour and Company B. F. Ascher & Company, Inc. Hoechst-Roussel Pharmaceuticals, Inc. Organon Inc. Reed & Carnrick Warner-Lambert Company	$16,999,000
VITAMINAS (SOLO POR PRESCRIPCION)	Abbott Laboratories The Central Pharmacal Company Lederle Laboratories Mead Johnson & Company Hoffmann–La Roche, Inc. Ross Laboratories E. R. Squibb & Sons, Inc. Warner-Lambert Company	$133,891,000

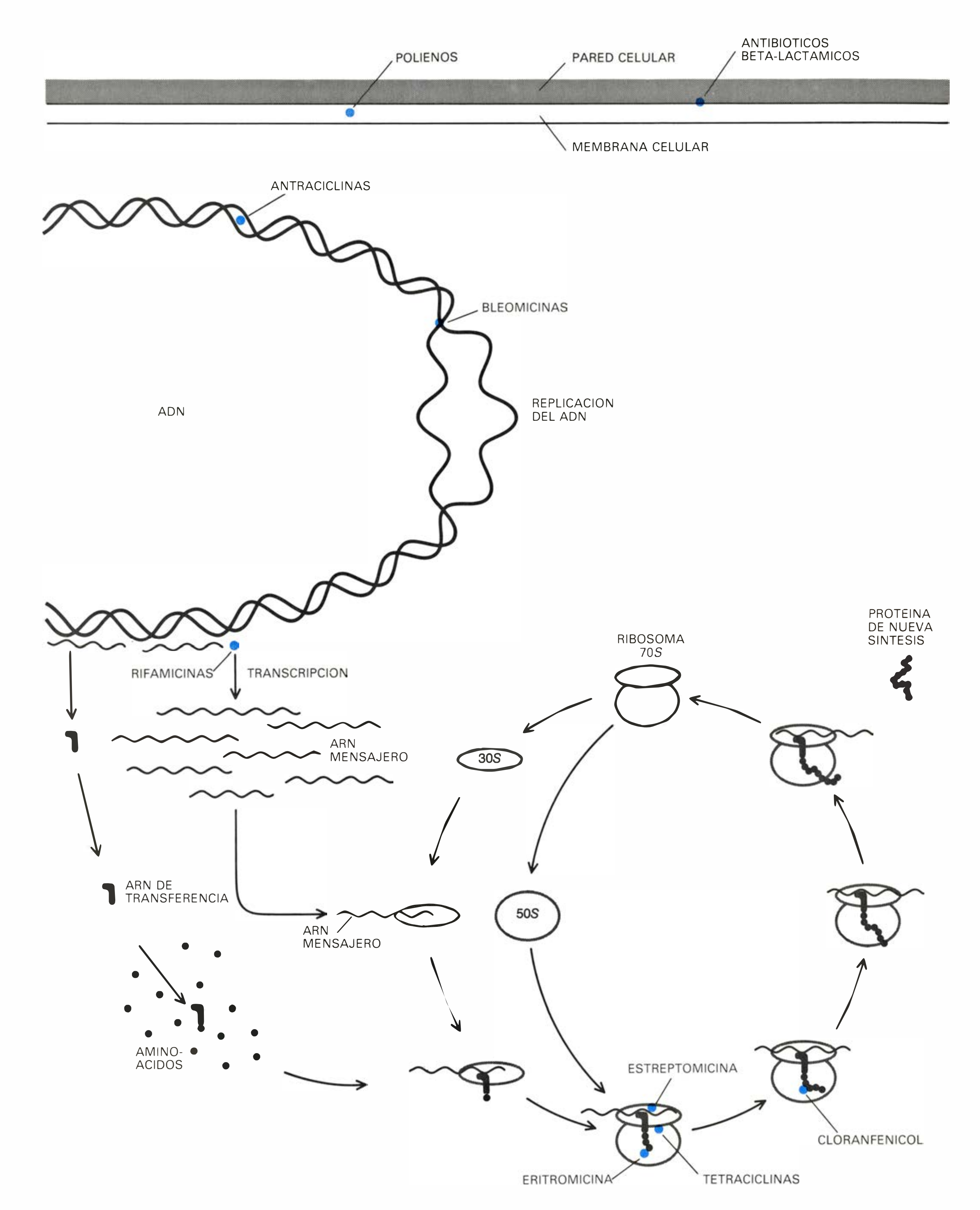
LAS VENTAS DE LAS TRES CATEGORIAS DE FARMACOS en cuya producción desempeñan un papel decisivo los microorganismos –agentes anti-infectivos, enzimas y vitaminas– están dominadas por los antibióticos sistémicos. Los datos muestran el valor de las ventas totales de fármacos en los Estados Unidos, a lo largo del ejercicio correspondiente al año 1979 y por compañías norteamericanas. Algunos de los agentes anti-infectivos se obtienen microbiológicamente; otros, no. Los antibióticos se elaboran, casi enteramente, por fermentación. Aparte de la penicilina, tienen importancia comercial las cefalosporinas, las tetraciclinas, la eritromicina y la estreptomicina. Los valores correspondientes a las vacunas y a las preparaciones antisépticas son aproximados. Antes de la introducción comercial de los antibióticos, las sulfonamidas constituían los principales agentes anti-infectivos; hoy integran sólo una pequeña parte del mercado. Entre las vitaminas, algunas se elaboran por fermentación y otras por métodos no biológicos.

ción. Los tanques, o fermentadores, donde se elaboran los fármacos alcanzan su volumen máximo en torno a los 100.000 litros. Los cultivos industriales de cepas de hongos o bacterias se incoan en tanques pequeños, desde donde se transfieren a los grandes fermentadores; una vez aquí, se mantiene un control estricto del *p*H, el suministro de oxígeno y la aportación de nutrientes requerida. Unas aspas o palas mantienen la mezcla agitada en el interior del fermentador.

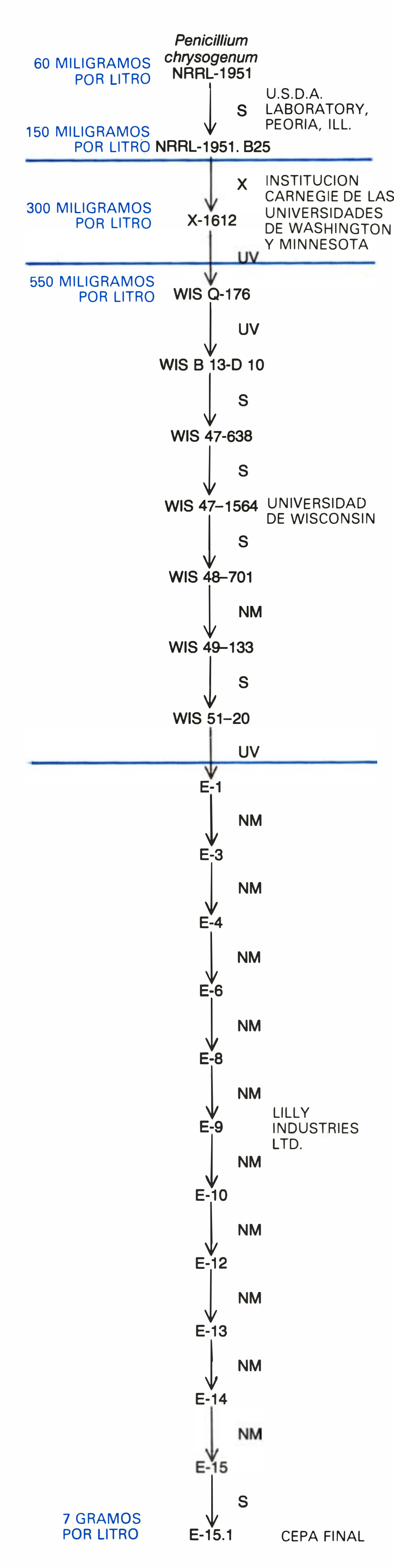
Los microorganismos responsables de la fermentación en la industria de los antibióticos se inscriben dentro de un margen taxonómico bastante limitado. En tres grupos principales los ha clasificado János Berdy, del Instituto de Investigación de Química Farmacológica de Budapest. Bastan seis géneros de hongos filamentosos para producir casi 1000 antibióticos diferentes. Entre esos hongos se cuentan los mohos del género *Cephalosporium*, productores de cefalosporinas, y el género *Penicillium*, que rinde penicilinas. Entre las bacterias no filamentosas hallamos dos géneros que vienen a sintetizar unos 500 antibióticos. Pero, con mucho, el mayor número de sustancias antibióticas tiene su fuente en los Actinomicetes, grupo adscrito a las bacterias filamentosas. Tres géneros de Actinomicetes elaboran hasta 3000 agentes antibióticos diferentes. La porción mayor corresponde al género *Streptomyces*, sintetizador también de las tetraciclinas.

No existe ninguna relación significativa entre el número de antibióticos que produce un género y su importancia clínica o comercial. Recordemos que de los 5000 conocidos hasta la fecha, sólo habrá un centenar en el mercado. Y de estos últimos, la mayoría proceden de los Estreptomicetes, que, en 1977, rindieron 69 productos. Aunque el comercio de los antibióticos está dominado por penicilinas y cefalosporinas. En efecto, de los 4200 millones de dólares que importaron las ventas mundiales de antibióticos en 1978, unos mil millones lo fueron de penicilinas y 500 de cefalosporinas. El grueso del resto correspondió a los antibióticos de origen actinomicete, donde hay que incluir los 1000 millones de dólares que movió la venta de tetraciclinas. A pesar de la utilidad de ciertos productos bacterianos en situaciones clínicas concretas, ninguno de ellos incidió de manera sensible en el mercado.

Que el margen taxonómico donde se hallan los organismos productores de antibióticos sea estrecho, no impide



DIVERSIDAD EXTREMA DE LOS LUGARES DE ACCION de los antibióticos, a lo largo de casi todos los procesos importantes del ciclo vital de la célula bacteriana. Las penicilinas y las cefalosporinas interfieren en la construcción de la pared celular bacteriana. Las bleomicinas y las antraciclinas interfieren en la replicación del ADN. Las rifamicinas evitan la transcripción del ADN a ARN mensajero. La estreptomicina, la eritromicina, el cloranfenicol y las tetraciclinas inutilizan el complejo ribosómico cuando el ARN mensajero se traduce a proteína. Estos procesos metabólicos bacterianos presentan ligeras diferencias respecto de los de las células de los mamíferos, por lo que los antibióticos son tóxicos para los microorganismos y no para los seres humanos. El tratamiento de las infecciones fúngicas y del cáncer no suele resultar tan eficaz, ya que se han encontrado muy pocas sustancias que presenten una toxicidad selectiva para las células tumorales y para los hongos. El desarrollo de agentes antitumorales sigue siendo, aún, básicamente empírico. Los polienos, entre ellos la anfotericina *B*, constituyen un grupo de agentes antifúngicos que entorpecen la función de la membrana de la célula fúngica.



que las moléculas que rinden diverjan ampliamente en estructura química y en función fisiológica. Hay antibióticos capaces de interferir casi todas las fases del ciclo vital de una célula bacteriana. Los hay, por contra, que atacan a las células fúngicas, aunque el número de ellos sea menor. Penicilinas y cefalosporinas obstruyen la formación de la pared celular bacteriana; los macrólidos de polieno, tales como la anfotericina *B*, provocan la disfunción de la membrana fúngica; bleomicinas y antraciclinas interfieren la replicación del ADN; las rifamicinas interrumpen la transcripción de ADN en ARN mensajero. Eritromicina, tetraciclinas y estreptomicina inutilizan el complejo ribosómico (el lugar de la síntesis de las proteínas).

Debido a la gran diversidad de estructura y de funciones que presentan los antibióticos, no es fácil pensar en una definición de los mismos. A modo de definición práctica, podríamos decir que un antibiótico es un producto microbiano de bajo peso molecular que entorpece específicamente el crecimiento de microorganismos, cuando se halla en cantidades extraordinariamente pequeñas. La mayoría de las sustancias que satisfacen esta definición son metabolitos fúngicos o bacterianos que aparentemente no desempeñan ningún papel en el crecimiento y mantenimiento de la célula. Dicho tipo de moléculas se denominan metabolitos secundarios, para distinguirlos de los metabolitos primarios, necesarios en el crecimiento del organismo. Los alcaloides, toxinas y pigmentos son también metabolitos secundarios, que se forman sólo después de haberse provocado el enlentecimiento del crecimiento celular, cuando la célula ha entrado en la etapa de su ciclo vital llamada idiofase. La función de los antibióticos en las células que los sintetizan no está muy clara; se ha sugerido que podrían inhibir el crecimiento de microorganismos competidores.

CONJUNTO DE MUTACIONES que hubo que provocar para crear una cepa de hongo *Penicillium chrysogenum* capaz de sintetizar la suficiente penicilina requerida por una explotación comercial. De radiaciones y agentes químicos se valieron cuatro grupos de investigadores para inducir mutaciones en el hongo. ("S" representa mutación espontánea; "X", rayos X; "UV", radiación ultravioleta y "NM", gas mostaza.) La selección de las mejores cepas dio lugar, finalmente, a la *E*15.1, que producía 55 veces más penicilina que las cepas de laboratorio. Otras mejoras simultáneas en las técnicas fermentativas aumentaron todavía más las producciones; las cifras expuestas aquí reflejan los dos tipos de aumento. Técnicas genéticas clásicas como éstas constituyen todavía un arma muy poderosa para la industria de los antibióticos, ya que la complejidad del proceso de la síntesis de antibióticos en los microorganismos dificulta enormemente el desarrollo de nuevas cepas por medio de la alteración directa de genes individuales. Los métodos fermentativos habituales rinden más de 20 g. por litro.

Como otros metabolitos secundarios, un antibiótico es el producto final de una larga serie de reacciones catalizadas enzimáticamente. En el proceso se hallan implicados muchos genes, tanto estructurales como reguladores; también deben sintetizarse precursores moleculares. La complejidad de las reacciones metabólicas que encierra la síntesis de un antibiótico tiene importantes repercusiones en la producción industrial y en los métodos de investigación empleados para mejorar el producto comercial.

A pesar de que los antibióticos poseen un amplio rango de estructuras químicas y muy variados lugares de acción, todos satisfacen el principio de toxicidad selectiva, formulado a principios de este siglo por Paul Ehrlich. Dicho principio mantiene que un agente quimioterapéutico eficaz no debe afectar a los tejidos humanos, y sí ser tóxico para el agente infectante. Aunque los procesos generales del metabolismo celular humano son similares a los de los organismos más simples, existen sutiles diferencias que pueden hacer que el antibiótico sea letal para el agente infectante e inofensivo para el paciente. Esta capacidad de discriminación es una propiedad esencial de la acción antibiótica. Ha sido relativamente fácil encontrar sustancias con toxicidad para bacterias, pero no se ha logrado el mismo éxito a la hora de buscar sustancias eficaces contra hongos, virus, parásitos y células tumorales.

En los años veinte, Alexander Fleming puso de manifiesto la toxicidad de la penicilina para las bacterias. Howard W. Florey, Ernst B. Chain y sus colegas, de la Universidad de Oxford, demostraron, en 1941, que su efecto era selectivo, ya que podía curar infecciones bacterianas. La penicilina es totalmente inofensiva para el hombre, pues su lugar de acción –la pared celular bacteriana– no tiene ningún equivalente en la célula humana. Aun así, ninguno de estos dos descubrimientos habría llevado a la obtención de un antibiótico con aplicaciones clínicas prácticas; la cantidad de penicilina fabricada por cepas de laboratorio del género *Penicillium*, unos miligramos por litro de cultivo, era demasiado pequeña para constituir la base de un proceso industrial.

En un intento por mejorar la cantidad de antibiótico producido, se escogió una cepa muy productiva de *Penicillium chrysogenum* y se sometió a múltiples agentes mutágenos; entre ellos,

PENICILINA *G*

CEFALOSPORINA *C*

METICILINA

CEFALOTINA

AMPICILINA

CEFALEXINA

ESTRUCTURA QUIMICA Y FUNCION de las penicilinas y las cefalosporinas. Se basan en el anillo beta-lactámico de cuatro miembros (*color*). De ahí que las drogas se llamen antibióticos beta-lactámicos. El anillo es esencial para la misión de estos compuestos: detener el levantamiento de la pared celular de la célula bacteriana. Si se añaden grupos laterales al anillo, aumentará la potencia del antibiótico y se realzarán sus propiedades farmacológicas. En el caso de las penicilinas varía sólo un grupo lateral. En el proceso de producción comercial, la penicilina *G* sirve de estructura central para la adición de nuevas cadenas laterales, una vez eliminado el grupo bencilo. La meticilina es resistente a la inactivación por enzimas bacterianos; la ampicilina se muestra eficaz contra las bacterias gram negativas. Mejoras estas que se obtienen a propósito de la penicilina *G* con sólo alterar el grupo lateral. Las cefalosporinas poseen dos cadenas laterales variables. La cefalosporina *C* se utiliza como estructura fundamental de forma semejante a la penicilina *G*.

gas mostaza, radiación ultravioleta y rayos X. También se aprovecharon las mutaciones espontáneas. Se examinaron las generaciones siguientes a las sometidas a mutágenos, para seleccionar a los mutantes con elevada productividad. Después de 21 rondas de mutación y selección, llevadas a cabo en diferentes laboratorios, se consiguió multiplicar la producción de penicilina por un factor de 55, lo que, combinado con mejoras en la tecnología fermentativa, permitió la obtención de 20 gramos por litro de cultivo, multiplicando así por 10.000 la producción recabada en el laboratorio de Florey.

Las técnicas genéticas clásicas, basadas en la mutación al azar, son muy laboriosas y entretenidas, en parte debido al hecho de que las mutaciones que incrementan la liberación de antibióticos no ofrecen ningún tipo de ventaja al microorganismo. Se hace pues imprescindible analizar muchas colonias de supervivientes para calcular sus tasas de producción de fármacos en condiciones de fermentación. A todo ello se une

CEFOXITINA

ACIDO CLAVULANICO

TIENAMICINA

NUEVOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS, descubiertos en caldos fermentativos de microorganismos del género *Streptomyces*, perteneciente a un subgrupo de bacterias filamentosas conocidas con el nombre de Actinomicetes. Hasta el aislamiento de sus productos, los hongos *Penicillium* y *Cephalosporium* habían sido las únicas fuentes de antibióticos beta-lactámicos. Las tres moléculas poseen actividad antibiótica; el ácido clavulánico es también un potente inhibidor de la acción de las beta-lactamasas, enzimas bacterianos capaces de anular la acción de los antibióticos beta-lactámicos por apertura de su anillo beta-lactámico. El ácido clavulánico, que inactiva el enzima por el método "suicida", se comercializa ya en combinación con la amoxicilina; el híbrido resultante, conocido con el nombre de augmentina, es un potente antibiótico resistente también a la inactivación de las beta-lactamasas.

el que los mutantes productivos aparecen con muy poca frecuencia. No obstante el refinamiento alcanzado por los métodos actuales, que se basan en la modificación de los distintos genes, las técnicas clásicas resultan aún indispensables para el mejoramiento de la producción de antibióticos.

¿A qué obedece esa vigencia de los métodos clásicos? La respuesta tiene que ver con la naturaleza de la síntesis de metabolitos secundarios. A diferencia de lo que ocurre con un polipéptido, que es un producto inmediato de un gen solo, los antibióticos se sintetizan por la acción conjunta de los productos de 10 o 30 genes. Para la mayoría de los antibióticos comerciales, se desconoce el proceso completo de síntesis. De ahí que los ensayos encaminados a alterar genes individuales apenas incidan en un aumento de la productividad. Una reciente e importante innovación en el proceso de selección genética ha sido la introducción de métodos automáticos para examinar los supervivientes del proceso de mutaciones inducidas y para identificar nuevas cepas que reporten un mayor rendimiento. Dicho equipo automático examina decenas de miles de tipos de supervivientes en cada ronda de mutación.

La penicilina se muestra extraordinariamente eficaz sobre un amplio rango de bacterias gram positivas. (Las bacterias se clasifican en gram positivas y gram negativas de acuerdo con el método de tinción desarrollado en 1884 por Hans Christian Joachim Gram; el ensayo refleja diferencias fundamentales de las paredes celulares de las bacterias.) La introducción de la penicilina en la práctica clínica permitió la curación rápida y completa de la mayoría de las faringitis estreptocócicas, neumonías pneumocócicas e infecciones producidas por estafilococos. Asimismo, la penicilina también curó serias y frecuentes enfermedades fatales, tales como la meningitis meningocócica y algunos tipos de endocarditis bacterianas.

Esos sorprendentes resultados clínicos estimularon la búsqueda de otros antibióticos naturales. Dicha búsqueda estuvo motivada por dos factores. Por una parte, la penicilina no alcanzaba la misma eficacia para las bacterias gram negativas; por otra, ciertas bacterias gram positivas poseían enzimas capaces de inactivar la penicilina, lo que confería a dichos organismos resistencia al antibiótico. Por medio de una técnica recién desarrollada para el examen de microorganismos del suelo, Selman A. Waksman y sus colegas, de la Universidad Rutgers, aislaron estreptomicina y otros antibióticos a partir de Actinomicetes del género *Streptomyces*, algunos de los cuales resultaron eficaces contra bacterias gram negativas y otros contra bacterias gram positivas. En 1945, G. Brotzu, del Instituto de Higiene de Cagliari, aisló el hongo *Cephalosporium acremonium* en las costas de Cerdeña. Las células de dicho hongo sintetizan varios antibióticos relacionados; entre ellos, la cefalosporina *C*, de especial eficacia contra las bacterias gram positivas patógenas, resistentes a penicilinas.

Aunque las penicilinas, la estreptomicina y las cefalosporinas fueron los descubrimientos más importantes del período inicial del desarrollo de los antibióticos, hubo otros muchos. El número de antibióticos descubiertos anualmente se incrementó de forma lineal desde finales de los cuarenta hasta principios de los setenta, intervalo de tiempo en que se llegaron a caracterizar unas 200 nuevas sustancias por año. A finales de la década de los setenta, esa cifra se elevaba a 300, de los cuales 150 los producían actinomicetes.

¿Qué ocurrió con la curva de comercialización de los nuevos descubrimientos? La proporción de los antibióticos que se fueron incorporando a la industria disminuyó rápidamente después de los años cincuenta. El descenso se debió, sobre todo, a la dificultad existente en aislar antibióticos suficientemente superiores a los comercializados como para garantizar su éxito clínico. A consecuencia de la aludida disminución y del desarrollo de resistencia a ciertos antibióticos por parte de las bacterias, la investigación sobre los antibióticos experimentó un cambio de rumbo; los estudios se centraron en la modificación de la estructura de los ya aislados al objeto de aumentar su potencia, protegerlos contra la inactivación bacteriana y mejorar sus propiedades farmacológicas.

Se concentró la atención en penicilinas y cefalosporinas. En unas y otras, la estructura central de la molécula es un anillo beta-lactámico de cuatro miembros, compuesto por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno; ambos grupos de antibióticos se conocen con el nombre de beta-lactámicos.

ENTRECRUZAMIENTO DE LAS CADENAS DE PEPTIDOGLUCANO durante la formación de la pared de la célula bacteriana. Los antibióticos beta-lactámicos interrumpen ese proceso. Cada cadena está integrada por unidades alternadas de los aminoazúcares N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). Las unidades de NAM están unidas a grupos polipeptídicos. El entrecruzamiento de los polipéptidos por medio de enlaces peptídicos confiere rigidez a la pared celular. En la bacteria *Staphylococcus aureus*, el entrecruzamiento se realiza al insertarse la unidad terminal de glicina de una cadena en el enlace que une a dos unidades de alanina de la otra cadena. Se elimina la alanina terminal y se forma un nuevo enlace entre la otra alanina y la glicina terminal. La formación de este enlace está catalizada por los enzimas transpeptidasa y carboxipeptidasa. Los antibióticos beta-lactámicos evitan la unión de las cadenas de peptidoglucano enlazándose a las peptidasas e inactivándolas, y son, por tanto, perjudiciales para células en crecimiento que se hallen en el proceso de formación de sus paredes.

PENICILINA *G*

PENICILIN ACILASA

ACIDO 6-AMINO PENICILANICO

$(CH_3)_2SiCl_2 + PCl_5$ −40° C.

H_2O 0° C.

BUTANOL −40° C

CONVERSION MICROBIOLOGICA de penicilina *G* en ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Además de ser más barata, presenta menos pasos que la conversión química. En la producción de penicilinas semisintéticas, el 6-APA interviene constituyendo un núcleo químico al que pueden unirse cadenas laterales, dando lugar a nuevos antibióticos. El proceso de conversión química comprende tres etapas que deben llevarse a cabo a baja temperatura y en condiciones anhidras estrictas, requiriéndose además varios solventes químicos. El proceso biológico se basa en bacterias que fabrican enzimas acilasas. Este enzima elimina el grupo bencilo y forma 6-APA. La fermentación se realiza en agua a 37 grados C., lo que reduce notablemente los costes.

Aparte de su amplio espectro de actividad antibiótica, los beta-lactámicos son probablemente los menos tóxicos de todos los grupos principales de antibióticos.

A pesar de que todavía no se han esclarecido totalmente los mecanismos por los cuales los antibióticos beta-lactámicos ejercen su acción destructora sobre las bacterias, parece bastante claro que interrumpen la formación de la pared celular. De manera específica obstruyen la síntesis y ensamblaje del peptidoglucano, principal constituyente de la pared; actúan uniéndose al menos a tres enzimas –transpeptidasa, carboxipeptidasa y endopeptidasa–, que catalizan la polimerización e inserción del peptidoglucano en la pared. La interrupción de este último proceso trae consigo la disolución y muerte de la célula. A la ubicuidad del peptidoglucano en la pared celular y a su ausencia en organismos superiores se debe la alta toxicidad selectiva de los antibióticos beta-lactámicos.

Durante más de 30 años, las únicas dos fuentes de antibióticos beta-lactámicos fueron los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Cephalosporium acremonium*. Recientemente, sin embargo, y en el seno de un intenso programa de análisis de microorganismos procariotas del suelo llevado a cabo por Eli Lilly y Co. y Merck, Sharp & Dohme, se han encontrado nuevos antibióticos beta-lactámicos en caldos fermentativos de estreptomicetes. Estos compuestos, las cefalomicinas, presentan una estructura similar a la de las cefalosporinas, con la adición de un grupo metoxil (CH_3O-) en el anillo beta-lactámico. En algunos casos, dicho grupo aumenta la eficacia del antibiótico frente a bacterias gram negativas y organismos resistentes a la penicilina.

En las décadas de 1960 y 1970, los esfuerzos por mejorar los antibióticos beta-lactámicos se centraron en la adición de nuevos grupos al anillo beta-lactámico. La metodología semisintética utilizada, seguida hoy en día en la elaboración de penicilinas y cefalosporinas, se basó en la sustitución de una cadena lateral, tras haber conseguido, en la fermentación, una molécula con el anillo central. La adición de nuevas cadenas laterales, metodología que vale también para los aminoglucósidos, estreptomicina incluida, puede mejorar la potencia, falta de toxicidad y estabilidad de la sustancia, así como aumentar el espectro de organismos sensibles al antibiótico.

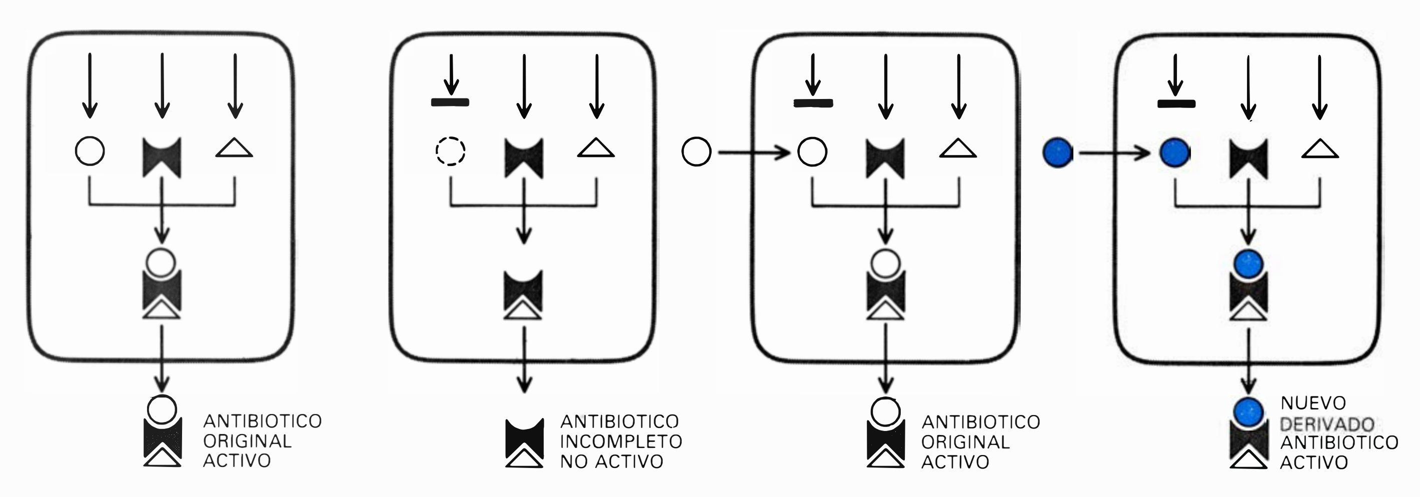
En la elaboración semisintética de la penicilina, se cultiva una cepa industrial de *Penicillium chrysogenum* en presencia de ácido fenilácetico, obteniéndose así la penicilina *G*. La penicilina *G* se produce a gran escala, en grandes tanques fermentadores programados para rendir una liberación casi continua de antibiótico. Para poner un ejemplo, la planta de producción de la compañía holandesa Gist-Brocades NV, en Delft, tiene 14 fermentadores, cada uno de ellos con una capacidad de 100.000 litros. El tiempo requerido para la fermentación es de 200 horas y se tardan 15 en recuperar el producto fermentado; y así, funcionando los 14 tanques de forma programada, la fábrica extrae antibiótico sin interrupción.

La fermentación se realiza a través de un proceso de "alimentación continua" en el que ininterrumpidamente se va agregando una solución azucarada al caldo fermentativo. El ácido fenilácetico es el precursor de la cadena lateral bencílica de la penicilina *G*. Terminada la fermentación, el espeso caldo se pasa a través de un filtro rotatorio, al objeto de separar las células fúngicas del medio líquido que contiene la penicilina; se lavan luego las células. Filtrado y lavados se someten entonces a un tratamiento con iones potasio en un extractor químico. De ello resulta una sal potásica cristalina de penicilina *G*. Una vez filtrada y desecada, esa sal potásica va a constituir un flujo de antibiótico con una pureza del 99,5 por ciento.

Después de su extracción, se vierte la penicilina *G* al caldo fermentativo de una cepa de bacterias que segregan un determinado tipo de enzimas, las llamadas acilasas. Estas proteínas eliminan selectivamente el grupo bencil de la molécula, liberando ácido 6-aminopenicilánico, o 6-APA. La estructura resultante tiene débiles propiedades antibacterianas. Y constituye un centro molecular de unión de grupos laterales, capaces de aumentar la potencia del antibiótico.

La metodología semisintética se ha aplicado también a la fabricación de las cefalosporinas. Se parte de la cefalosporina *C*, obtenida de *Cephalosporium acremonium*. La cefalosporina *C* actúa tanto sobre bacterias gram positivas como sobre gram negativas, pero su actividad es insuficiente para la práctica clínica. Al eliminar una cadena amida lateral de la molécula se obtiene, sin embargo, el ácido 7-alfa-amino-cefalosporánico, o 7-ACA, cuya utilidad es similar a la del 6-APA. Así, añadiendo cadenas laterales apropiadas, se sintetizan múltiples cefalosporinas.

A pesar de su vigorosa eficacia, los



BIOSINTESIS MUTACIONAL, o mutasíntesis. Se trata de un método muy sobrio para la elaboración de nuevos antibióticos. La inducción de una mutación en el gen que codifica para un precursor del antibiótico natural de un microorganismo lleva a la síntesis de una molécula de antibiótico incompleta, pues carece de un determinado constituyente químico. Cuando se añade el precursor que falta al medio en que se desarrolla el microorganismo, se reanuda la producción del antibiótico natural. No hay más que añadir precursores con estructuras ligeramente diferentes, para obtener nuevos antibióticos.

antibióticos beta-lactámicos pueden verse contrarrestados por la resistencia bacteriana. La base bioquímica de la resistencia reside en la rotura o hidrólisis del enlace del anillo beta-lactámico denominado amidacíclico. Dicha hidrólisis impide que la molécula se una a las peptidasas bacterianas. La destrucción del antibiótico está catalizada por los enzimas beta-lactamasas, ampliamente distribuidos entre las bacterias, Actinomicetes, cianobacterias (algas azulverdosas) y levaduras. Además, los enzimas se transmiten de un microorganismo a otro por medio de plásmidos que portan el gen que codifica esa proteína. El uso generalizado de los antibióticos ha creado una presión selectiva que favorece la supervivencia de los microbios que han adquirido el gen.

Objetivo central de la investigación en este campo es acabar con el problema de la actividad enzimática bacteriana contra los antibióticos beta-lactámicos, y con esa meta se diseñaron dos estrategias. Por un lado, se buscaron antibióticos naturales que no fueran sensibles a la acción de las beta-lactamasas. En este sentido, hace cinco años, en el curso de una investigación sobre inhibidores de la síntesis de peptidoglucano, expertos de la compañía Merck, Sharp & Dohme descubrieron una nueva clase de antibióticos beta-lactámicos. Estos compuestos, las tienamicinas, se hallaron en caldos fermentativos de *Streptomyces cattleya* y resultaron de extraordinaria potencia contra muchas bacterias gram positivas y gram negativas; lo que era más importante, inactivaban las beta-lactamasas de dichas bacterias.

La segunda estrategia consiste en combinar, con antibióticos beta-lactámicos, sustancias que, aunque no posean actividad antibiótica, sean potentes inhibidores de las beta-lactamasas. De esta forma se obtiene una mezcla que resiste la inactivación. Investigadores de la firma inglesa Beecham Pharmaceutical Company identificaron los ácidos clavulánico y olivánico como inhibidores de la beta-lactamasa; dichas sustancias comparten la estructura beta-lactámica, aunque su efecto más potente se basa en la inactivación de los enzimas. Jeremy Knowles y sus colegas, en recientes estudios realizados en la Universidad de Harvard, han demostrado que los ácidos clavulánico y olivánico inactivan al enzima por el método "suicida". Dichas moléculas se unen a la molécula de beta-lactamasa, iniciando una reacción catalítica; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otras sustancias beta-lactámicas, que son hidrolizadas y luego liberadas, dichos ácidos permanecen unidos al lado activo del enzima, anulando cualquier tipo de actividad. El ácido clavulánico es un inhibidor efectivo de las beta-lactamasas de los microorganismos más importantes desde el punto de vista clínico. La augmentina, antibiótico de introducción reciente fabricado por Beecham, es una combinación del beta-lactámico amoxicilina y del ácido clavulánico.

A las técnicas genéticas clásicas de identificación de metabolitos naturales y semisíntesis se acaban de sumar nuevos métodos genéticos, que enriquecen las posibilidades del biólogo. En este sentido podemos citar la biosíntesis mutacional o mutasíntesis; consiste en crear un microorganismo, por medio de una mutación específica, que sea incapaz de sintetizar un determinado precursor molecular de un antibiótico. Añadiendo entonces un precursor con una estructura química ligeramente distinta, puede llegar a sintetizarse un nuevo antibiótico.

Otro método tiene que ver con la dependencia, crítica, del metabolismo secundario respecto de los niveles de metabolitos primarios presentes en la célula. Así, entre los sustratos de la síntesis de antibióticos se encuentran carbohidratos, aminas, purinas, pirimidinas, ácidos grasos y moléculas activadas de acetil y propionil. La tasa de producción de antibióticos se encuentra limitada por la disponibilidad de un metabolito primario. Cuando este es el caso, y cuando se ha llegado a identificar el gen para el metabolito primario, es posible crear, por manipulación genética, una cepa que produzca más precursor; el resultado es un aumento en la producción de antibiótico. Uno de nosotros (Aharonowitz) se ha servido de esta estrategia para aumentar la producción de cefalosporinas de *Streptomyces clavaligerus*.

Los antibióticos son capaces de inhibir el crecimiento de las propias células que los sintetizan, mientras lo hacen con las bacterias patógenas. Por cuya razón, el antibiótico se elabora normalmente cuando el crecimiento de dichas células ha cesado. Pero hay cepas de mutantes que son resistentes a sus propios antibióticos y muestran, por tanto, un elevado rendimiento. Tal es el caso de ciertas cepas de *Streptomyces aureofaciens*, que resisten muy bien altas concentraciones de su propio antibiótico, la clorotetraciclina, y cuya productividad es máxima.

En oposición a la identificación, modificación y producción de sustancias eficaces contra las infecciones bacterianas, que ha aportado excelentes resultados, la búsqueda de agentes similares para combatir las infecciones

ESTIGMASTEROL

HO

PASOS QUMICOS

DIOSGENINA

HO

O

O

PASOS QUIMICOS

PROGESTERONA

O

O

HIDROXILACION MICROBIANA

11 ALFA-OH-PROGESTERONA

O

O

PASOS QUIMICOS

DESHIDRO-GENACION MICROBIANA

OH

HO

O

PASOS QUIMICOS

PASOS QUIMICOS

PASOS QUMICOS

COMPUESTO *S*

OH

O

OH

O

HIDROXILACION MICROBIANA

HIDROCORTISONA

OH

O

OH

HO

O

DESHIDROGENACION MICROBIANA

PREDNISOLONA

OH

O

OH

HO

O

PASOS QUIMICOS

CORTISONA

OH

O

OH

O

O

DESHIDROGENACION MICROBIANA

PREDNISONA

OH

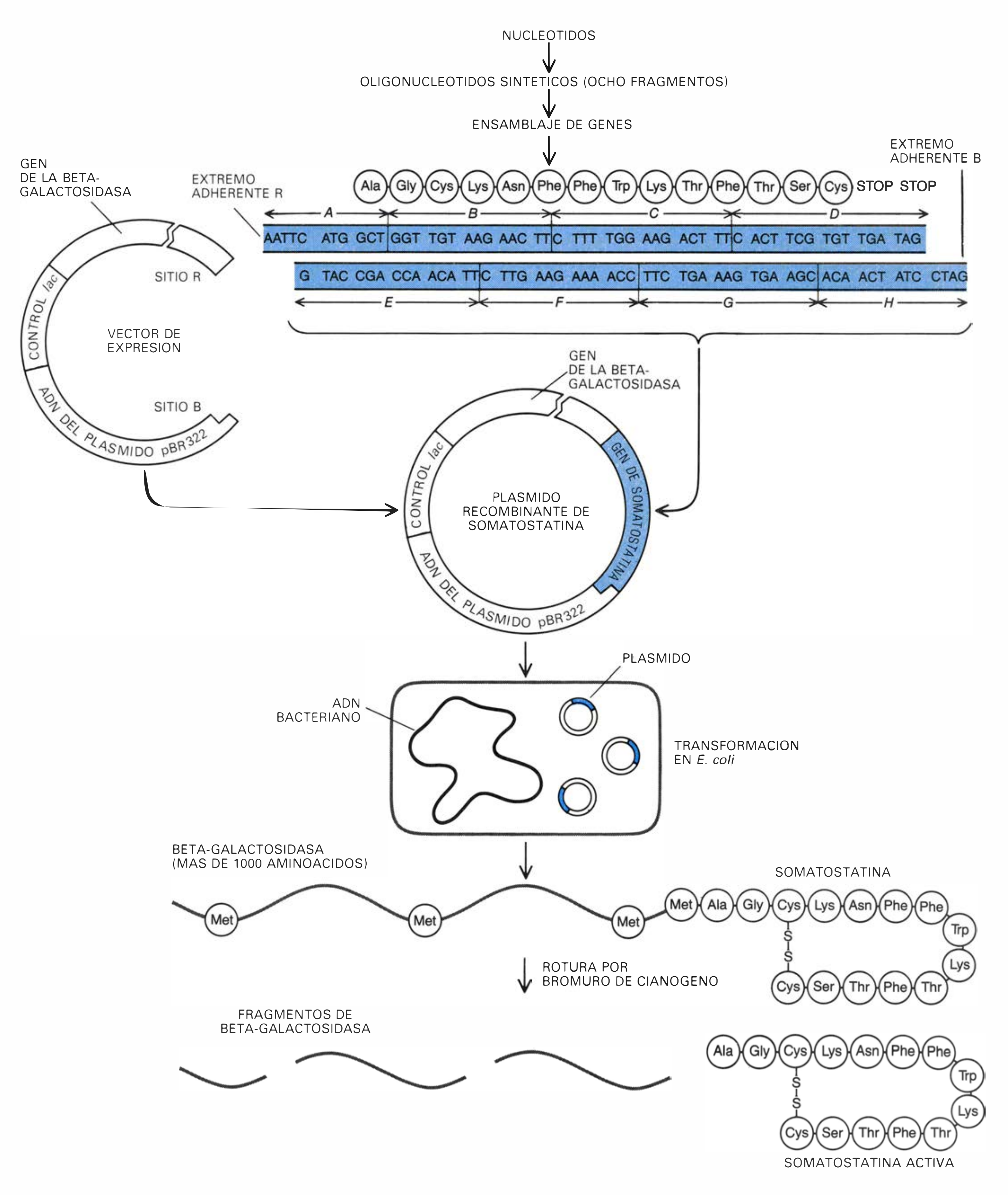
O

OH

O

O

EN LA ELABORACION DE ESTEROIDES participan ciertos microorganismos a lo largo de varias etapas, dentro de un proceso general de síntesis química. La materia prima para la producción de esteroides son los esteroles, alcoholes complejos. El estigmasterol es un producto derivado de la industria del aceite de soja; la diosgenina se extrae de las raíces de la planta mexicana de barbasco. Los esteroles se transforman, a través de una serie de reacciones químicas, en uno de los dos intermediarios siguientes: compuesto *S* y progesterona. A continuación, por mediación de un hongo (*Rhizopus nigricans* o *Curvularia lunata*, según el compuesto intermediario), se hidroxila la molécula añadiendo un grupo hidroxilo (−OH) al núcleo esteroideo de cuatro anillos. Este paso microbiológico resultó clave para el desarrollo de una tecnología, comercialmente viable, de elaboración de esteroides. La hidroxilación química es un proceso complicado y difícil; así, la metodología biológica redujo los 37 pasos de que consta la síntesis estrictamente química a 11, lo cual rebajó considerablemente los costes de producción. Los esteroides, ampliamente utilizados en el control de inflamaciones, se situaron así al alcance económico de la mayoría de los pacientes. El otro paso microbiológico importante es la deshidrogenación: eliminación de dos átomos de hidrógeno del núcleo esteroideo. Hay procesos industriales distintos que secundan este mismo esquema general de producción: la cortisona, la hidrocortisona, la prednisolona y la prednisona, todas ellas moléculas de gran importancia médica con propiedades farmacológicas diferentes de las que caracterizan a los esteroides naturales.



SINTESIS DE SOMATOSTATINA, el primer polipéptido humano producido por células bacterianas. Se realiza mediante la inserción del gen de la somatostatina en el genoma de las bacterias a través de un vector de conversión, construido parcialmente a partir de un plásmido. La somatostatina es una hormona hipotalámica de 14 aminoácidos que controla la liberación de varias hormonas hipofisarias. El gen se construyó de ocho bloques de fragmentos de ADN monocatenario, de unos pocos nucleótidos cada uno, representados en este esquema simplificado como *A-H*. Los fragmentos poseían secuencias complementarias solapadas para permitir el correcto ensamblaje del gen. De los 52 pares de bases del gen, 42 constituían el código para la somatostatina, proporcionando el resto los dos "extremos adherentes" que permitieron la inserción del gen en el plásmido y que incluían la información necesaria para la correcta expresión del gen y la recuperación de la hormona. El vector de expresión se construyó a partir del plásmido pBR322, al que se había añadido la región de control y la mayor parte del gen de la beta-galactosidasa del operón *lac* bacteriano. La beta-galactosidasa es un enzima que interviene en el metabolismo de la lactosa; la región de control contiene los mecanismos reguladores necesarios para la expresión del gen. El gen de la somatostatina se insertó en el plásmido junto al gen de la beta-galactosidasa; a continuación, se introdujo el plásmido en células de la bacteria *Escherichia coli*, que sintetizaron la hormona humana en forma de una pequeña cola de polipéptidos al final del enzima; la hormona se liberó de éste por tratamiento con bromuro de cianógeno. La somatostatina así sintetizada es idéntica a la humana, pero se había obtenido de microbios que carecían de información para su síntesis.

virales y fúngicas y para tumores, se encuentra todavía en una fase muy primitiva. El inconveniente de la mayoría de los agentes antifúngicos y antitumorales estriba en su falta de selectividad. Suelen dañar las células de los mamíferos, además de cumplir esa misión con los organismos patógenos o las células cancerosas. La mayor parte de los agentes antifúngicos son tóxicos si se toman por vía endógena; requieren, por consiguiente, una administración tópica, esto es, sobre la parte afectada. Aunque hay metabolitos microbianos que inhiben el crecimiento tumoral, éstos también son tóxicos.

Una sustancia antitumoral que ha merecido especial atención es el glucopéptido bleomicina, aislado por Hamao Umezawa y sus colegas, del Instituto de Química Microbiológica de Tokio, a partir de caldos de cultivo de *Streptomyces verticillus*. Actúa, según se cree, uniéndose al ADN de las células tumorales y rompiéndolo; también obstruye la replicación del ADN y el ARN. Tenemos otro grupo de sustancias antitumorales importante, desde el punto de vista clínico, en el compuesto integrado por una unidad de aminoglucósido y la molécula de antraciclina. Dichas sustancias inhiben también la síntesis de ADN y ARN. Desgraciadamente, bleomicina y antraciclinas son, potencialmente, nocivas para el corazón.

La identificación de agentes antitumorales eficaces, que sigan el modelo de los antibióticos, tendrá que basarse necesariamente en las diferencias de estructura y función entre las células del tumor y las células normales. Puesto que es muy poco lo que sabe sobre las diferencias esenciales entre las células normales y las tumorales, el proceso de desarrollo de los agentes antitumorales es, básicamente, empírico; así ocurrió también con los antibióticos en sus comienzos. El Instituto Nacional del Cáncer, de los Estados Unidos, ha iniciado una amplia campaña investigadora cuyo objetivo es identificar agentes tóxicos selectivos contra células tumorales.

En la producción industrial de antibióticos beta-lactámicos, la mayor parte de la información necesaria para la síntesis, si no toda, se encuentra en el genoma del microorganismo, siendo las modificaciones químicas necesarias de escasa importancia. Ahora bien, en la fabricación de otros tipos de fármacos los microorganismos participan sólo en pasos aislados, o bioconversiones, incluidos en un proceso mucho más largo, que descansa, principalmente, en síntesis no biológica. Sólo, pues, la información para ciertos pasos aislados reside en el genoma de la célula; el ADN que contiene estas instrucciones constituye una parte, muy pequeña, del complemento genético celular.

Los resultados más convincentes de los métodos de bioconversión se han obtenido en la síntesis de hormonas esteroideas. A principios de los años treinta, Edward C. Kendall, de la Fundación Mayo, y Tadeus Reichstein, de la Universidad de Basilea, aislaron la cortisona, esteroide secretado por las glándulas suprarrenales. Una década más tarde, Philip S. Hench, de la Fundación Mayo, demostró que la administración de cortisona podía aliviar el dolor de los pacientes con artritis reumática. La respuesta inmediata fue una gran demanda de la hormona. Se desarrollaron métodos químicos para su síntesis, pues el mercado potencial era, a todas luces, ingente. La síntesis química requería 37 pasos, algunos muy críticos, lo que se traducía en un coste muy caro del producto: fabricada en esas condiciones, valía unos 200 dólares por gramo.

Una de las mayores dificultades que presenta la síntesis química de cortisona es la introducción de un oxígeno en la posición 11 de la estructura de cuatro anillos del esteroide. Se trata de un paso crucial para la actividad fisiológica de la molécula. En 1952, D. H. Peterson y Herbert C. Murray, de la Upjohn Company, descubrieron que la cepa del hongo del pan *Rhizophus arrhizus* hidroxilaba progesterona, otro esteroide, introduciendo un átomo de oxígeno en la posición 11. La progesterona es un intermediario precoz del proceso de síntesis de cortisona; y por medio de la utilización de la hidroxilación microbiana (que se lleva a cabo en la industria con microorganismos estrechamente emparentados con *R. arrhizus*), la síntesis de cortisona se redujo de 37 a 11 pasos, abaratándose, en consecuencia, los costes. El precio de la cortisona pasó a ser de 6 dólares por gramo.

Además de la reducción de la síntesis química, el descubrimiento de la hidroxilación microbiana de la progesterona trajo consigo importantes repercusiones económicas. El proceso fermentativo podía llevarse a cabo a 37 grados Celsius, con agua como solvente y a presión atmosférica. Las reacciones efectuadas en estas condiciones son mucho más baratas que las que se realizan en condiciones extremas de temperatura y presión y con disolventes distintos del agua, como sí exigía la primitiva síntesis química de cortisona.

De entonces acá se han encontrado otras funciones a desempeñar por los microorganismos en la síntesis industrial de esteroides. Así, entre los esteroides de interés comercial recordaremos los corticosteroides cortisona, hidrocortisona, prednisona y dexametasona, el andrógeno testosterona, el estrógeno estradiol (los dos últimos se utilizan como contraceptivos) y la espironolactona (un diurético). Para la fabricación de todos ellos se parte de esteroles, alcoholes complejos. Las fuentes principales de esteroles son los residuos de la producción de aceite de soja, ricos en estigmasterol y sitosterol, y las raíces de la planta de barbasco mexicana, que contienen diosgenina.

En la producción de esteroides a partir de esteroles vegetales consiste el primer paso en la degradación de la cadena lateral de la molécula de esterol. Algunas compañías farmacéuticas utilizan para ello una micobacteria (grupo de bacterias aeróbicas gram positivas), abaratándose así una fase que antes se hacía por métodos no biológicos. Las micobacterias recurren a los esteroles para abastecerse de carbono y energía; las cepas mutantes que carezcan de ciertos enzimas no pueden completar la degradación. Pero se aprovechan los tales mutantes para degradaciones parciales que rinden importantes metabolitos intermediarios. También existen otras bacterias que modifican el núcleo esteroideo, dando lugar a gran cantidad de derivados.

Ni que decir tiene que la introducción de estos procesos microbiológicos ha incidido de forma significativa en la fabricación de esteroides; primero, al posibilitar su síntesis comercial y luego, al rebajar paulatinamente el coste unitario de producción. En 1980, el gramo de cortisona valía, en los Estados Unidos, 46 centavos de dólar, lo que supuso una reducción de un 400 por ciento sobre el precio original. El constante descubrimiento de nuevas aplicaciones para los esteroides (contracepción, tratamiento de insuficiencias hormonales, enfermedades de la piel, inflamaciones y alergias), unido a una producción más eficaz de los mismos, ha generado una amplia demanda de dichos fármacos. En este sentido, el volumen total mundial de ventas de los cuatro principales esteroides (cortisona, aldosterona, prednisona y prednisolona) rondó los 300 millones de dólares en 1978. Se trata de los productos comerciales más importantes que se obtienen de los procesos de bioconversión, pero no son los únicos.

Adelantábamos al principio que había una tercera clase de procesos microbiológicos involucrados en la elabo-

ración de fármacos: aquella en la que la información que codificaba el producto no procedía del ADN del organismo de partida, sino que dicha información se introducía luego en la célula. El gen que determina la estructura del producto se sintetiza químicamente o se aísla de otro organismo. A continuación, se introduce, por alguno de los métodos al uso, en el interior de la célula. Una vez allí, la maquinaria preexistente para la expresión génica construye la molécula deseada.

Con el desarrollo de métodos para la transferencia de genes específicos de una célula a otra, y para la inducción de la expresión de los mismos en el nuevo huésped, la industria farmacéutica ha adquirido una gran potencialidad. Algunas compañías farmacéuticas han empezado ya la producción de polipéptidos humanos (pequeñas cadenas de aminoácidos) por bacterias.

El primer péptido humano sintetizado por una célula bacteriana fue la hormona hipotalámica somatostatina. Pertenece ella a un grupo de hormonas sintetizadas por el hipotálamo, situado en la base del cerebro; un denso sistema de vasos sanguíneos la transporta a la hipófisis, donde actúa inhibiendo la secreción de insulina y la hormona humana del crecimiento. Investigadores del City of Hope National Medical Center de Duarte, California, y de la Universidad de California en San Francisco, escogieron como objeto de estudio a la somatostatina en 1977, por su simplicidad, pues consta de sólo 14 aminoácidos. Así, aunque todavía no se había aislado el gen de la somatostatina humana, se pudo deducir la secuencia de nucleótidos a partir del orden conocido de los aminoácidos en el péptido. Ello posibilitó la construcción de un gen sintético con bloques de tres nucleótidos. De los 52 pares de bases de que constaba el gen sintético, 42 constituían el gen estructural para la somatostatina. Los restantes nucleótidos se incorporaron para proporcionar "extremos adherentes" que permitieran unir el fragmento del ADN de doble cadena a un plásmido, así como facilitar la correcta expresión génica y la recuperación de la hormona.

GEN PARA LA HORMONA HUMANA DEL CRECIMIENTO, creado mediante una combinación de síntesis química y aislamiento de la molécula natural. La hormona humana del crecimiento es un polipéptido de 191 aminoácidos elaborado por los tejidos de la hipófisis. El interés médico que despierta esta hormona se basa en el hecho de que su déficil conlleva una forma de enanismo que puede curarse por administración de la misma. El segmento del gen que codifica para los primeros 24 aminoácidos del péptido se construyó químicamente a partir de bloques de nucleótidos. Para la obtención del resto del gen se utilizaron una serie de enzimas, tal y como se muestra en el diagrama simplificado. Se empleó transcriptasa inversa para copiar el gen que codificaba para la hormona a partir del ARN mensajero obtenido de los tejidos de la hipófisis humana, aprovechando endonucleasas de restricción para cortar el fragmento requerido; asimismo se usaron ADN ligasas para unir los fragmentos naturales y sintéticos. Una vez entero, se insertó el gen en una versión modificada del plásmido pBR322 que poseía el operón *lac*. La parte sintética del gen de la hormona del crecimiento se construyó con su propio codón de iniciación (*ATG*), el grupo de tres bases que proporciona la señal para que comience el proceso de transcripción.

Había que insertar el gen en células de la bacteria *Escherichia coli*. A tal fin, se combinó el gen sintético con un plásmido, identificado por pBR322, y con un segmento del operón *lac* del genoma de *E. coli*. (El operón *lac* está formado por tres genes unidos físicamente, que intervienen en el metabolismo de la lactosa, y por los elementos genéticos que controlan su transcripción y traducción.) El gen sintético se insertó cerca del final del gen que codifica el enzima beta-galactosidasa. Y así, cuando se introdujo el plásmido en la célula de *E. coli*, se sintetizó somatostatina a modo de apéndice caudal unido al enzima. Por tratamiento con bromuro de cianógeno, que rompe proteínas en polipéptidos por el aminoácido metionina, se pudo recuperar la somatostatina libre. Comoquiera que el gen se había sintetizado químicamente, sólo era necesario colocar una metionina delante de la molécula de somatostatina. Este modo de proceder venía urgido por el hecho siguiente: cuando se elabora somatostina independientemente del enzima, sufre la degradación inmediata por proteínas bacterianas. La somatostatina fabricada por *E. coli*

es idéntica a la hormona natural humana, siendo la producción de 10.000 moléculas de somatostatina por célula, producción lo bastante alta para estimular la síntesis industrial de nuevos polipéptidos.

En este sentido, se han utilizado técnicas similares para la síntesis bacteriana de insulina y hormona del crecimiento humanas e interferones. Así, la producción de insulina ha resultado aún más eficiente que la de somatostatina, liberándose 100.000 moléculas por célula bacteriana, lo cual es aún más satisfactorio si se tiene en cuenta la mayor importancia médica de la insulina. La insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas de 21 y 30 aminoácidos. El equipo de Roberto Crea, Adam Kraszewski, Tadaaki Hirose y Keiichi Itakura, del City of Hope National Medical Center, construyeron, en unos tres meses, los genes que codifican para los dos polipéptidos. Utilizaron 18 fragmentos de unos pocos nucleótidos cada uno para el gen de la cadena larga y 11 fragmentos para el gen del pelipéptido más corto. Cada gen sintético se unió a un plásmido cerca del extremo del gen de la beta-galactosidasa, como se hizo con la somatostatina. Después de la expresión del gen y de la traducción del ARN mensajero a proteína, los dos polipéptidos se separaron del enzima y se unieron para constituir la molécula de insulina.

La aplicación de las técnicas microbiológicas a la fabricación de insulina puede cambiar sustancialmente el valor de mercado de dicha hormona. La insulina utilizada corrientemente en la terapia de la diabetes se extrae del páncreas de ganado o de cerdo. Dicha insulina difiere ligeramente en su secuencia de aminoácidos de la insulina humana, y aunque la mayoría de dichas insulinas controlan los principales síntomas del diabético, no impiden efectos secundarios, como deterioramiento renal y de la retina; además, algunos diabéticos son alérgicos a las hormonas animales.

Si la insulina humana fabricada por bacterias es capaz de contrarrestar estas anomalías, dicha insulina ocupará un lugar preferente en el mercado mundial de la hormona, que se estima en unos 200 millones de dólares. En este sentido, la empresa Eli Lilly ha anunciado ya planes de introducción del proceso comercial para la venta de insulina humana basada en síntesis bacteriana. Si se puede elevar el nivel de producción hasta el de los demás procesos industriales que utilizan *E. coli*, se podrían alcanzar los 100 gramos de insulina purificada en 2000 litros de caldo fermentativo. Para obtener una cantidad equivalente de hormona animal se necesitan más de 700 kilogramos de glándulas pancreáticas.

La producción de somatostatina e insulina por métodos microbiológicos se basa en la síntesis de genes estructurales. Pero con los métodos de que se dispone hoy en día resulta comercialmente práctico sintetizar genes para péptidos que consten de más de 30 aminoácidos; por desgracia, la mayoría de las proteínas de interés clínico son mucho más largas. La solución reside en el aislamiento de un gen natural. El punto de partida de este proceso es el ARN mensajero que codifica la secuencia de nucleótidos del polipéptido. Por mediación de la transcriptasa inversa se fabrica, a partir del ARN mensajero, una copia complementaria de ADN. A continuación, se replica repetidamente el ADN de doble cadena y se escoge un vector apropiado para introducirlo en las células bacterianas.

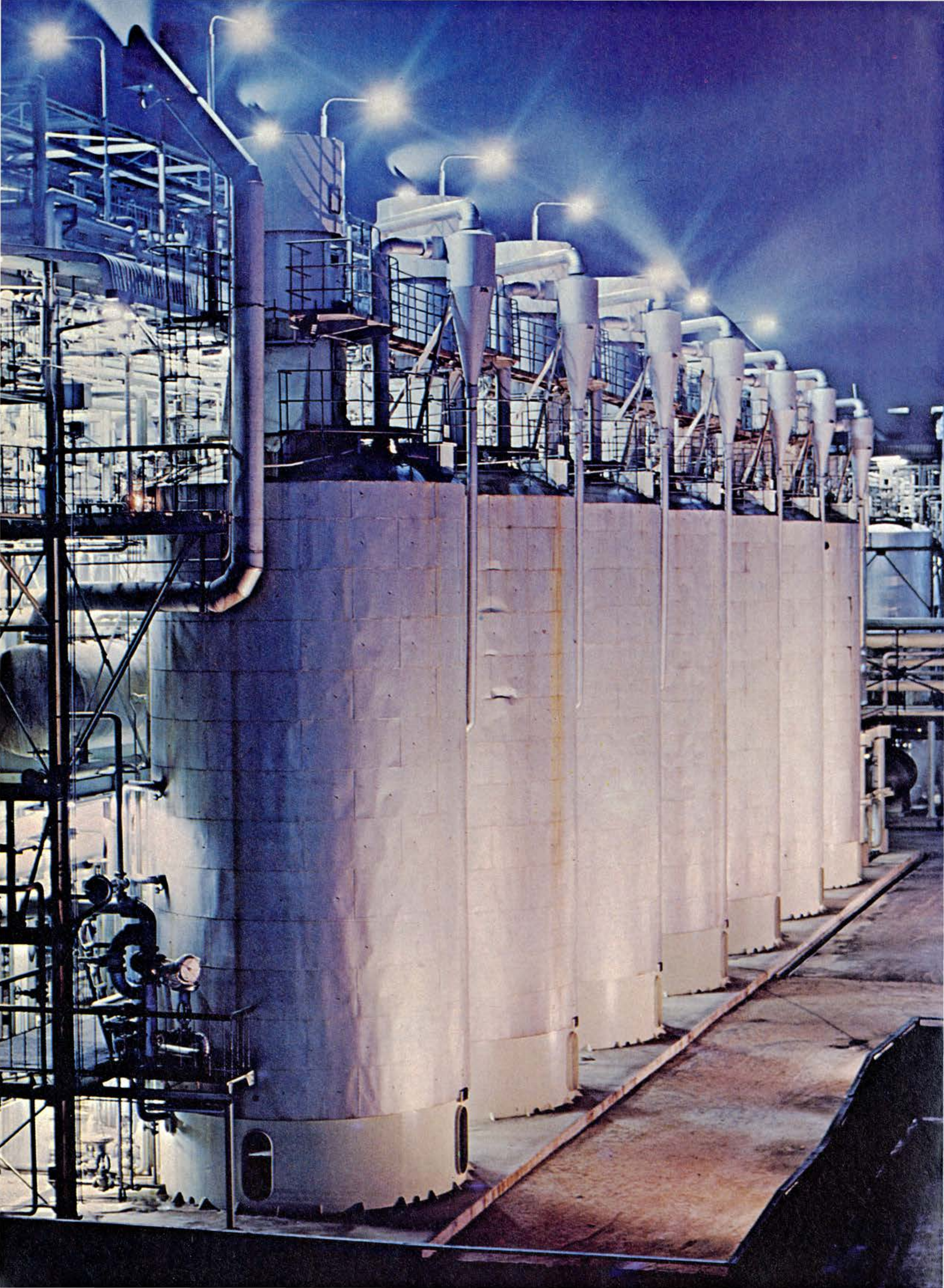
La metodología expuesta está empezando a dar sus primeros frutos en la producción de hormona humana del crecimiento e interferones. La deficiencia en hormona del crecimiento hipofisaria conduce a una forma de enanismo que puede curarse por administración de la hormona. Dicha hormona es característica de cada especie; su fuente habitual ha venido siendo cadáveres humanos. Su escasa disponibilidad, aún a pesar de sus muchas aplicaciones clínicas, ha constituido un factor condicionante del desarrollo de la investigación sobre la misma. La utilización de técnicas microbiológicas para aumentar la producción de la hormona puede aumentar su disponibilidad comercial y potenciar la investigación de sus aplicaciones. La compañía Genentech, una de las firmas establecidas para explotar la tecnología del ADN recombinante, se ha asociado a la compañía sueca Kabi Gen AB, para la elaboración de hormona humana del crecimiento.

Entre todos los polipéptidos cuya producción podría llevarse a cabo por las bacterias, los que tienen una aplicación a la vez más prometedora y más incierta son los interferones. Según parece, poseen efectos antivirales, que se ponen de manifiesto más en la prevención que en la curación de infecciones de tipo vírico. Pueden manifestar también un efecto inhibidor de células tumorales. Los interferones se sintetizan por los leucocitos (células sanguíneas blancas) y por los fibroblastos (células de los tejidos conectivos). La mayoría de los que se dispone hoy en día se han extraído de células humanas; el rendimiento es muy bajo: dos litros de sangre humana producen un microgramo de interferón leucocítico.

Merced a los avances registrados en las técnicas del ADN recombinante, se ha llegado a obtener 600 microgramos de interferón de leucocitos a partir de un litro de caldo fermentativo, lo que supone un rendimiento mil veces superior al conseguido por litro de sangre. Ese progreso ha podido realizarse tras una serie de modificaciones en el proceso de producción, muchas de ellas ideadas por David Goeddel y sus colegas, de Genentech, y por Charles Weissman y sus colegas, de la empresa BioGen. Hay cuatro empresas, por lo menos, interesadas en la explotación comercial de la producción de interferón. Entre los resultados más destacados anotemos la fabricación de interferones de óptimo rendimiento a partir de levaduras por medio de un proceso fermentativo.

Los métodos recombinantes, en particular los que se aplican a la producción de interferones, pueden suponer un próximo gran paso hacia adelante de la medicina clínica y la industria farmacéutica. Al margen de los interferones y la insulina no debe descartarse en este proceso industrial la síntesis de factores de coagulación (proteínas sanguíneas necesarias para la coagulación de la sangre), enzimas que puedan servir para reemplazar la terapia seguida en las enfermedades congénitas, uroquinasa (enzima que disuelve los coágulos), inmunoestimulantes (proteínas que aceleran las reacciones inmunes), anticuerpos y las proteínas antigénicas que se encuentran en la superficie de los virus, que podrían utilizarse en la elaboración de vacunas.

La introducción de nuevos métodos genéticos en clínica difícilmente podría traer consigo cambios aún más radicales que los que supuso el descubrimiento y utilización de los antibióticos. Los métodos asociados a los antibióticos implicaron cambios drásticos en tres áreas: práctica clínica, investigación y desarrollo y producción industrial. La elaboración de polipéptidos humanos por microorganismos puede llevar a la utilización de un amplio espectro de sustancias de muy diverso uso clínico, como los interferones, que presentan propiedades clínicas tan innovadoras como las que aportaron los antibióticos. Sin embargo, en las áreas de investigación y desarrollo y en la de producción industrial, no representan más que una extensión de los métodos genéticos y las técnicas fermentativas que rigen ya, a gran escala, en la industria farmacéutica.



Elaboración microbiológica de productos químicos industriales

Tradicionalmente, se han venido sintetizando, a partir de carburantes fósiles, toneladas de productos químicos. La subida del precio del petróleo hace cada vez más atractiva la producción por fermentación a partir de otras materias

Douglas E. Eveleigh

La capacidad sintetizadora de los microorganismos no se agota en el sector alimentario y farmacéutico. Fabrican también productos químicos de uso industrial que pueden aprovecharse como tales o emplearse para fabricar, a su vez, disolventes, lubricantes, emolientes, demulcentes, extractores, adhesivos, acidulantes, plásticos, revestimientos de superficie, explosivos, propulsores, aditivos para gasolinas, carburantes alternativos, pesticidas, colorantes, cosméticos, anticongelantes, líquido para frenos, ablandadores de carnes, digestivos, vitaminas y aromatizantes. En varias ocasiones, a lo largo del siglo XX, la fermentación microbiológica ha sido el método escogido para fabricar ácido cítrico, ácido láctico, etanol, *n*-butanol y, más recientemente, enzimas.

Es un hecho frecuente que una sustancia orgánica con aplicaciones industriales pueda obtenerse biológicamente o bien por síntesis química. La decisión de fabricarla por uno u otro camino suele depender, a final de cuentas, de alguna razón económica. Y uno de los principales puntos a tener en consideración es el costo de las materias primas. En la fermentación microbiológica, la materia prima es el sustrato que permite el crecimiento, generalmente melazas o almidón; en la síntesis química, la materia prima es, con frecuencia, el petróleo o uno de sus derivados. Hay que ponderar también el rendimiento del proceso. ¿Qué fracción del sustrato se convierte en producto y cuánto tiempo dura la conversión? Un tercer factor a atender es el costo de la recuperación del producto, a partir del medio de fermentación o de la materia prima en la síntesis química. Por último, es preciso valorar el potencial de productos secundarios y el costo que supone la eliminación de los residuos.

Se sabe que los microorganismos producen unas 200 substancias de valor comercial. Pero sólo unas pocas se fabrican por métodos biológicos en la industria. Entre ellas figuran el etanol, el *n*-butanol, la acetona, el ácido acético, el ácido cítrico, aminoácidos y enzimas. Consideraciones de tipo económico vienen sugiriendo que los microorganismos desempeñarán un papel más importante en muchas industrias, a lo largo de nuestra década. Debido al aumento del precio del petróleo, la industria de productos químicos sintéticos ya no goza de las ventajas de una materia prima abundante y barata. En tanto que la llegada de las técnicas del ADN recombinante convierte en más atractivas todavía las fermentaciones.

Hasta hace poco, el microbiólogo industrial trabajaba con un genoma microbiano definido. Los principales métodos disponibles consistían en buscar los mejores organismos entre los que resultaban de una serie de mutaciones al azar o bien manipular las condiciones de su crecimiento y modificar así, en su favor, las rutas reguladoras. Con los nuevos métodos genéticos de programación, el microbiólogo puede sustituir una ruta existente por otra nueva conducente a más elevados rendimientos, a síntesis más rápidas o más eficientes. Dicho de otra manera, puede construir organismos con nuevas características y capacidades. La fermentación microbiológica, en conjunción con las nuevas técnicas de programación genética, contribuirá, de manera significativa, a la fabricación de tres grandes clases de productos industriales: enzimas, compuestos orgánicos alifáticos y aminoácidos. Vamos a ocuparnos de cada uno de ellos, sucesivamente.

Los enzimas catalizan tanto la formación como la rotura de enlaces químicos. Pero su explotación comercial ha sacado más partido de la segunda clase de catálisis: la descomposición de macromoléculas, hidratos de carbono y proteínas por ejemplo. De la mayor importancia en los procesos industriales es la especificidad de los enzimas. Cada enzima actúa sólo sobre una determinada molécula sustrato.

Por tratarse de proteínas, cuyo funcionamiento depende de la precisa secuencia de los aminoácidos que forman su estructura, no resulta práctica la síntesis química de enzimas a gran escala. Los fabrican microorganismos crecidos en cultivo o se obtienen directamente a partir de vegetales y animales. Hoy, los costos hacen que resulten más favorables los métodos microbiológicos. Una excepción importante es la papaína, que se utiliza como digestivo y ablandador de carnes; procede de la papaya.

La explotación comercial de los enzimas arranca de la última década del siglo pasado, cuando se introdujo extractos de células fúngicas en las industrias cerveceras para acelerar la degradación del almidón a azúcar. Se fabrican ya

LOS TANQUES DE FERMENTACION EXTERIORES contienen microorganismos que convierten el azúcar en los aminoácidos ácido glutámico y lisina. El ácido glutámico sirve como exaltador del aroma, bajo la forma de la sal glutamato monosódico (MSG). Aunque la lisina es un aminoácido esencial para la nutrición del hombre y de animales que no sean rumiantes, ni uno ni otros pueden sintetizarla. Se añade a los piensos animales. Cada tanque tiene una capacidad de 63.420 galones (241.000 litros) y mide unos 250 metros de altura. La fotografía muestra siete de los veinte tanques idénticos de la planta industrial que la empresa Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., posee en Hofu, Japón. Los tanques, construidos a principios de la década de 1970, son los mayores de la planta para la producción de aminoácidos. Kyowa Hakko produce anualmente, al menos, 20.000 toneladas de MSG y 10.000 toneladas de lisina. Los aminoácidos se fabrican a través de un proceso aerobio; el tubo que sale de cada tanque, y se ve atravesando un embudo, permite la salida de gases. Los aminoácidos constituyen una clase de productos químicos industriales que pueden sintetizarse por vía microbiana; dos clases más son enzimas y compuestos orgánicos alifáticos.

cuatro enzimas a gran escala: proteasa, glucamilasa, alfa-amilasa y glucosa-isomerasa. La proteasa abarca, en realidad, varios enzimas que degradan las proteínas al actuar sobre los enlaces peptídicos. La principal proteasa industrial, obtenida a partir de la bacteria *Bacillus licheniformis*, se utiliza, sobre todo, como agente de limpieza en los detergentes. Proteasas de otras bacterias y hongos se emplean, en menor escala, como adyuvantes de la digestión en piensos para animales y como ablandadores de carnes. Las amilasas son una familia de enzimas que rompen el almidón, primero en cortas cadenas y luego en glucosa libre. La glucosa isomerasa convierte la glucosa en su esteroisómero fructosa, que es un edulcorante.

La fermentación industrial de los cuatro enzimas ronda las 1270 toneladas, por año; producción que se reparte así: 530 toneladas de proteasa, 350 de glucamilasa, 320 de alfa-amilasa y 70 toneladas de glucosa isomerasa. Cuya venta global, a nivel mundial, supone ahora unos 300 millones de dólares. El sector se halla en manos de compañías europeas, de las que Novo Industri, de Dinamarca, y la holandesa Gist-Brocades NV poseen el 60 por ciento del mercado mundial. Cabe esperar que la industria se expanda a lo largo de los próximos diez años, conforme las técnicas del ADN recombinante se vayan aplicando a la producción microbiológica de enzimas. Por ser un producto directo de un gen, el rendimiento del enzima puede mejorarse introduciendo múltiples copias del gen dentro del ADN del organismo, maximizando la expresión del gen mediante la inserción de sitios reguladores en el ADN, llamados promotores, y facilitando la secreción del enzima por la célula.

Si quisiéramos ejemplificar el valor de los enzimas sintetizados microbiológicamente, en un proceso determinado, recordaríamos la conversión de almidón en jarabe de maíz, un edulcorante rico en fructosa que está desplazando rápidamente a la sacarosa en las bebidas refrescantes. Aunque se trata de una técnica recentísima, ya está proporcionando más de dos millones de toneladas de ese jarabe, al año. La conversión se desarrolla a lo largo de tres pasos, definidos por la acción sucesiva de los enzimas alfa-amilasa, glucamilasa y glucosa-isomerasa sobre la materia prima.

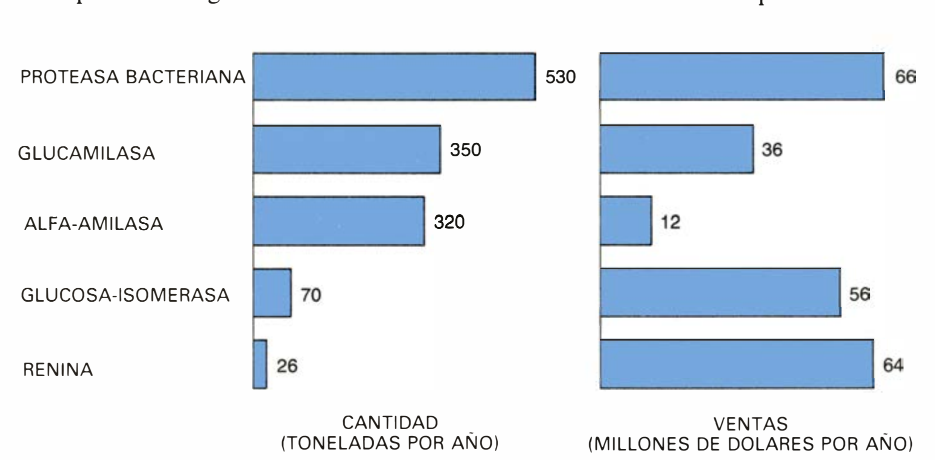
El costo de la fabricación de edulcorantes de fructosa depende, en parte determinante, de la eficiencia con que pueden obtenerse los enzimas. Bunji Marou y sus colaboradores, de la Universidad Nihon, han incrementado el rendimiento de alfa-amilasa procedente de *Bacillus subtilis*, en aproximadamente unas 200 veces, al combinar el clásico método de mutación y selección con la técnica de la recombinación genética. Han hallado cierto número de pasos reguladores (que controlan la síntesis de alfa-amilasa) que actúan sinérgicamente, y así aprovechar mejor las cepas seleccionadas de *B. subtilis*.

Las técnicas del ADN recombinante se han aplicado también a la producción de alfa-amilasa estable a elevadas temperaturas. *B. subtilis* crece a temperatura ambiente. La alfa-amilasa que produce se desnaturaliza fácilmente con el calor. Si el enzima pudiese ejercer su función a una temperatura elevada, la conversión catalítica del almidón en glucosa podría darse a una tasa más alta. ¿Cómo conseguirlo? Una forma sería la de insertar el gen que codifica para el enzima alfa-amilasa de una bacteria termófila en el genoma de *B. subtilis*. Las bacterias termófilas viven bajo condiciones de elevada temperatura y fabrican enzimas que son resistentes a la inactivación por calor. Pero no pueden explotarse para producir alfa-amilasa, ya que apenas se conoce su estructura genética. Shoji Shinomiya y sus colaboradores, de la Universidad de Tokio, han demostrado que podemos lograr una gran producción de alfa-amilasa termoestable, mediante la inserción de un gen de la amilasa, procedente de una bacteria termófila, dentro de *B. subtilis*.

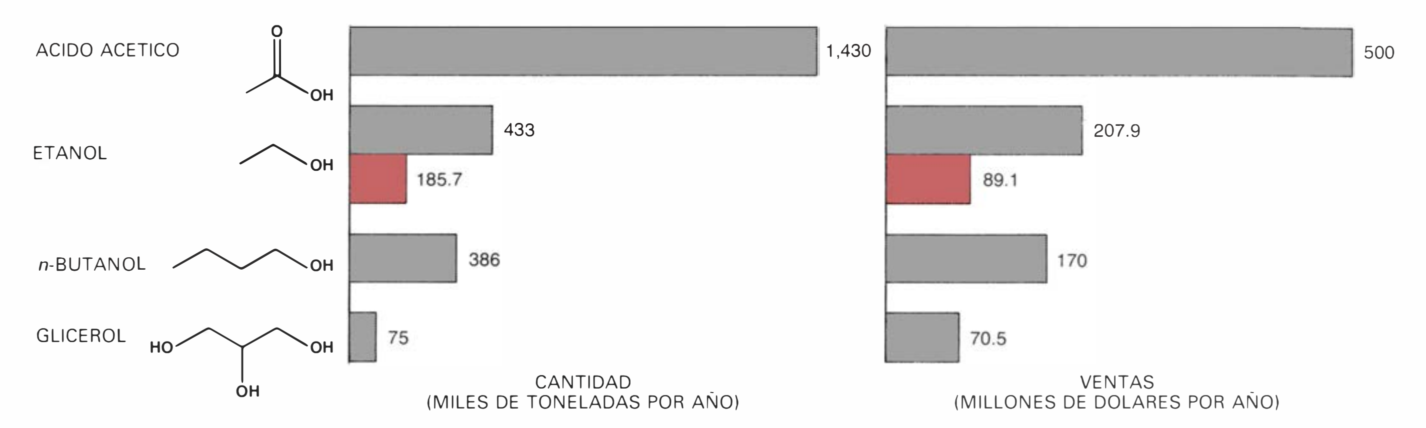
Otro camino para incrementar el rendimiento en la fabricación de fructosa sería condensar, en un solo paso, los tres que se siguen ahora. Lo que sería un hecho incorporando genes para alfa-amilasa, glucamilasa y glucosa isomerasa dentro de un mismo organismo. El almidón se convertiría entonces en un jarabe de maíz rico en fructosa, dentro de un tanque de fermentación único.

Otro campo prometedor, donde los enzimas de origen microbiano podrían intervenir satisfactoriamente, es el de la industria de los plásticos, que mueve un capital de 50.000 millones de dólares. Varios plásticos se fabrican por polimerización de óxidos de alquenos, es decir, óxidos de compuestos carbonados de cadena lineal en los que al menos uno de los enlaces entre átomos de carbono es un doble enlace. Hasta el presente, los óxidos de alquenos se vienen fabricando por síntesis química a partir de productos petroquímicos. Mas Saul L. Neidleman, de la Cetus Corporation, acaba de proponer una forma elegante de abordar por métodos enzimáticos la síntesis de óxidos de alquenos. Peter J. Farley, presidente de Cetus, espera introducir comercialmente la síntesis enzimática de óxido de propileno antes de 1990, cuyo volumen de ventas mundial se estima oscilará entre los 2000 y 3000 millones de dólares al año.

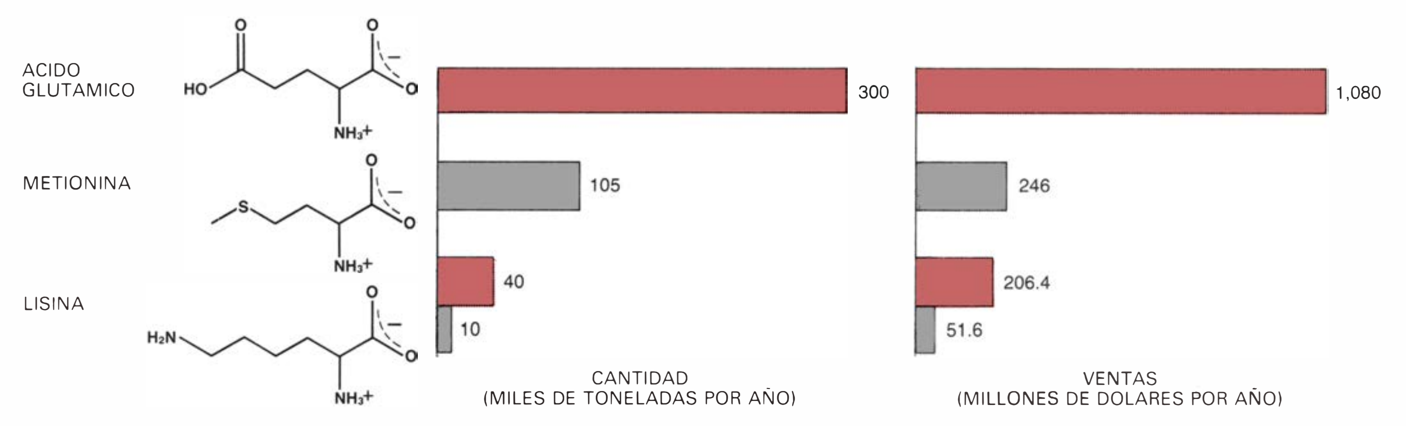
La síntesis enzimática de óxidos de alquenos a partir de alquenos recae en tres catalizadores: la piranosa-2-oxidasa, procedente del hongo basidiomiceto *Oudemansiella mucida*, una haloperoxidasa del hongo *Caldariomyces*, o de otro origen, y una epoxidasa procedente de *Flavobacterium*. En el primer paso de la síntesis, el enzima piranosa-2-oxidasa promueve la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sir-



VENTA MUNDIAL DE ENZIMAS a lo largo del ejercicio correspondiente al año 1980. Se comercializaron 300 millones de dólares. La ilustración recoge el número de toneladas por año (*a la izquierda*) y las ventas (*a la derecha*), en el caso de cinco enzimas producidos en gran escala por métodos microbiológicos. La proteasa bacteriana, que degrada la proteína mediante rotura del enlace peptídico, sirve, sobre todo, de agente limpiador. Los enzimas alfa-amilasa, glucamilasa y glucosa-isomerasa se utilizan principalmente para convertir almidón en jarabe de maíz, rico en fructosa, un edulcorante en creciente expansión, que está ocupando el lugar de la sacarosa en las bebidas refrescantes. Las amilasas degradan el almidón para dar glucosa; la glucosa isomerasa convierte la glucosa en fructosa. La renina se emplea en la fabricación del queso. Puede extraerse del cuarto estómago de una ternera o vaca o fabricarla microorganismos. Los datos proceden de la Oficina de Asesoramiento Tecnológico y de J. Leslie Glick, de la Genex Corporation.



VOLUMEN DE VENTAS de los compuestos orgánicos alifáticos, aparte del metano. Alcanzaron en 1980, en los Estados Unidos, un montante equivalente a los 3000 millones de dólares. Entre los compuestos alifáticos se incluyen solventes y ácidos orgánicos. Los cuatro aquí representados se fabrican en grandes cantidades: ácido acético, etanol, *n*-butanol y glicerol. No figura el etanol destinado a bebidas alcohólicas ni el ácido acético empleado como vinagre. Los cuatro compuestos pueden fabricarse por métodos microbiológicos, pero sólo el etanol se viene obteniendo así en la industria; si bien el 70 por ciento del etanol industrial se sintetiza todavía abióticamente a partir de derivados del petróleo. Las barras de color indican síntesis biológicas y las grises no biológicas. Hay varias razones que abonan la esperanza de que la industria alifática adopte la fermentación: el precio del petróleo, la posibilidad de explotar bacterias termófilas (adaptadas al calor) y la perspectiva de nuevas materias primas. Datos de la U.S. International Trade Commission.



VOLUMEN DE VENTAS de aminoácidos. El comercio mundial barajó cifras que rondaron los 1700 millones de dólares en 1980. Los tres aminoácidos a que se hace referencia aquí son los que se fabrican en mayores proporciones: ácido glutámico, metionina y lisina. El ácido glutámico se sintetiza por fermentación. Al igual que la lisina, la metionina es un aminoácido esencial para la nutrición y se fabrica comercialmente como componente adicional de los piensos animales. La metionina se industrializa por síntesis química, en tanto que el 80 por ciento de la lisina se produce biológicamente. Cada aminoácido tiene dos isómeros, uno sólo de los cuales participa en las reacciones biológicas. La fermentación proporciona únicamente el isómero biológicamente activo; en la síntesis química, empero, la mitad del rendimiento corresponde al inactivo. Esta especificidad determina que el método biológico rinda más, aunque no siempre ha sido posible su explotación. A medida que vayamos avanzando en el conocimiento del metabolismo celular, se irán incorporando en el proceso de fermentación los aminoácidos de valor industrial. Los datos proceden de la Oficina de Asesoramiento Tecnológico y de J. Leslie Glick.

viendo la glucosa de sustrato y de fuente de energía. En el segundo paso, que está mediado por la haloperoxidasa, el peróxido de hidrógeno se combina con el alqueno y un ion halógeno (fluoruro o bromuro) para formar una halohidrina del alqueno: un alqueno ligado a un grupo hidroxilo (−OH) y a un halógeno. En la etapa final, mediada por la epoxidasa, se retiran el hidrógeno del grupo hidroxilo y el halógeno, dejando el óxido de alqueno.

La producción enzimática de óxidos de alqueno podría tener ventajas económicas sobre la síntesis química. Un ion halógeno lo puede proporcionar una sal simple, el cloruro sódico por ejemplo, y resulta, por tanto, menos caro que un halógeno elemental, que es el que se requiere para la síntesis química. El sistema enzimático puede, además, generar productos secundarios, tales como fructosa y ácido glucónico. (Este último se añade a los detergentes para friegaplatos, porque evita la precipitación de sales de calcio y de magnesio que pueden dejar manchas sobre la superficie del vidrio.) La producción de fructosa a partir de glucosa, en la propuesta hecha por Neidleman, cobra un interés máximo si atendemos al creciente uso de la fructosa como edulcorante. En el esquema de Neidleman, la conversión de la glucosa en glucosona, primero, y, luego, en fructosa tiene un rendimiento del 100 por cien. La ventaja es obvia en comparación con el máximo rendimiento de un 50 por ciento que se obtiene en la conversión enzimática del almidón en jarabe de maíz rico en fructosa.

Otra cualidad de la síntesis enzimática de óxidos de alquenos es su flexibilidad: cambiando el sustrato sobre el que actúa la haloperoxidasa, puede ajustarse el proceso para que proporcione distintos óxidos de alquenos, tales como óxido de propileno para el plástico polipropileno y óxido de etileno para el plástico polietileno. Y otra ventaja todavía: ausencia de contaminantes, ya que puede reciclarse el halógeno. Cabe presumir, además, un refinamiento del sistema enzimático con las técnicas del ADN recombinante. De entrada, la programación genética permitiría elevar el rendimiento de los tres enzimas, a partir de sus fuentes microbianas. Una posibilidad interesante, pero más remota, consiste en exaltar el comportamiento de los enzimas, modificando sus sitios activos.

Los enzimas producidos comercialmente están desempeñando una función creciente en el diagnóstico médico. Por ejemplo, el enzima colesterol-oxidasa se emplea para vigilar el nivel de colesterol en el suero sanguíneo y el enzima uricasa sirve para controlar el nivel de ácido úrico.

La propia tecnología del ADN recombinante requiere ciertos enzimas,

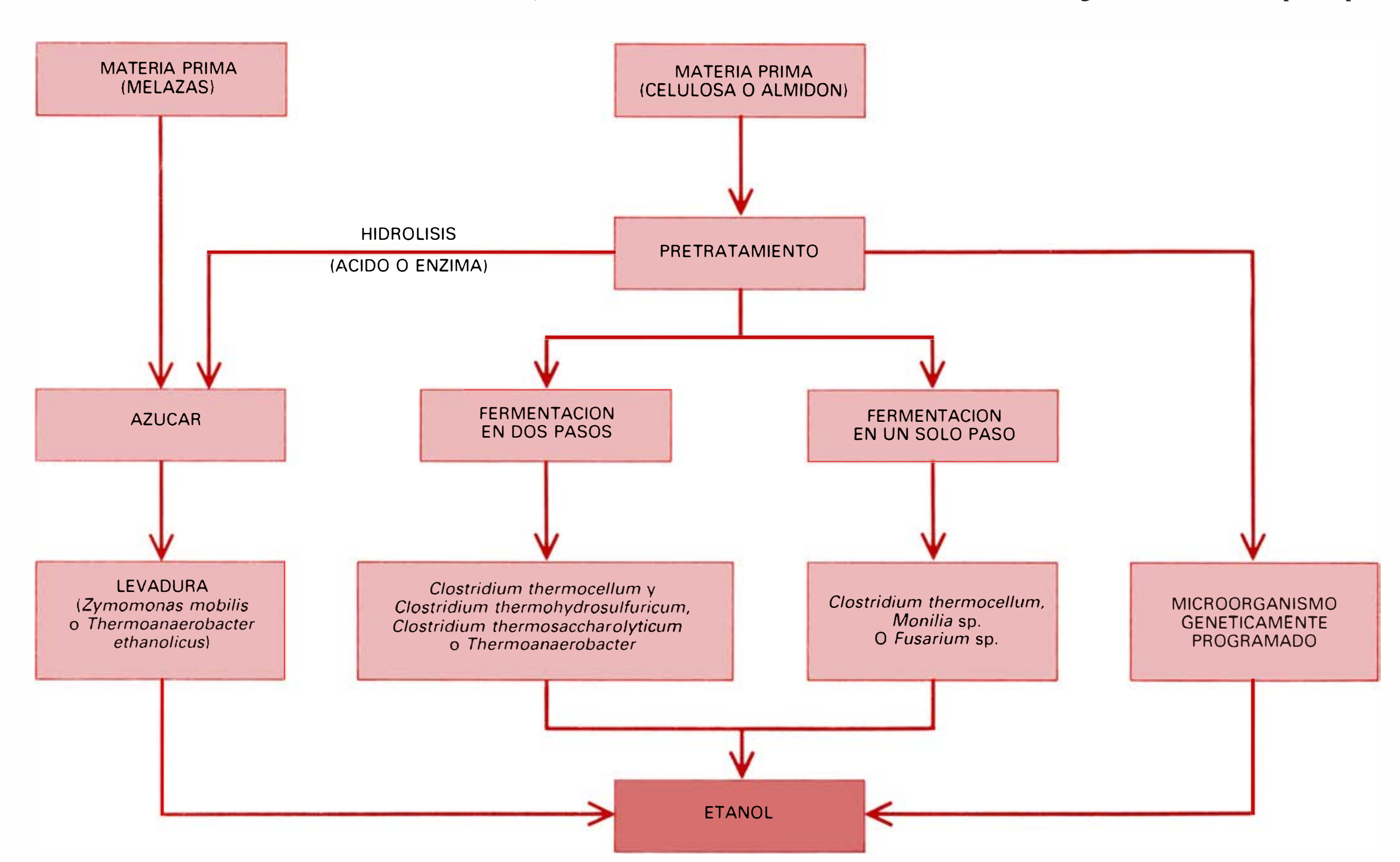
tales como endonucleasas de restricción, para cortar y abrir el ADN, y ligasas, para volver a unir los extremos abiertos. Las compañías que trabajan con ADN recombinante tienen un claro interés en la producción barata de estos enzimas. Ronald W. Davis y sus colaboradores, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, han logrado incrementar 500 veces el rendimiento de ligasa mediante la inserción de múltiples copias del gen de la ligasa en el genoma de *Escherichia coli*. Los enzimas requeridos por las técnicas del ADN recombinante han resultado provechosos para el diagnóstico médico. A modo de ejemplo, la detección prenatal de la anemia falciforme puede hacerse mediante la aplicación de una endonucleasa de restricción al ADN de las células del feto que hay en el líquido amniótico. Este método no comporta ninguno de lo riesgos de la técnica tradicional de diagnóstico en la que se extrae sangre del feto.

Las técnicas del ADN recombinante tienen mucho que ofrecer a la industria de los enzimas, amén de servir para potenciar el rendimiento de enzimas. La modificación directa del gen podría proporcionar enzimas con mayor actividad específica y superior termoestabilidad. En el horizonte aparece ya la posibilidad de diseñar y sintetizar enzimas según convenga. Otros factores de relevancia económica en la producción de enzimas se refieren a un mayor aprovechamiento de las materias primas y de otros materiales crudos, la inhibición de la síntesis de enzimas no deseados y una recuperación más eficiente de los enzimas a partir de soluciones diluidas. Factores todos ellos que pueden modificarse con las técnicas de programación genética.

Técnicas capaces, además, de elevar el rendimiento operativo del fermentador. Cuando el agente fermentador es un hongo, los largos filamentos del micelio quedan a veces entrelazados como un nudo de fideos, lo que les impide tomar los nutrientes del medio de una manera efectiva. Si llegara el momento en que pudiéramos modificar la estructura genética del hongo, de suerte que no creciese dando filamentos, sino células aisladas, consumiría más nutrientes y fermentaría mucho mejor.

La segunda clase en importancia del sector químico es la industria de los compuestos orgánicos alifáticos, que se distinguen por carecer de anillos bencénicos y estructuras similares. Las sustancias alifáticas con aplicaciones industriales pueden dividirse, a grandes rasgos, en dos categorías: disolventes y ácidos orgánicos. Entre los primeros se engloban el etanol, el *n*-butanol, la acetona y el glicerol; entre los ácidos orgánicos figuran el ácido acético, el ácido cítrico y el ácido láctico. En general, los disolventes no suelen fabricarse por métodos biológicos a escala industrial, aunque hubo una época en que el *n*-butanol, la acetona y el glicerol se industrializaron así. Pero los disolventes habrán de retornar a la fermentación, tal como están los costes de los productos petroquímicos, las perspectivas de explotación de las bacterias termófilas y la disponibilidad de nuevas materias primas.

Las bacterias termófilas se desarrollan rápidamente en un intervalo de temperaturas que va desde los 60 hasta los 75 grados Celsius. Su principal



PARA LA SINTESIS BIOLOGICA DE ETANOL se sigue, en líneas generales, el mismo método empleado para la fabricación de bebidas alcohólicas. Lo que no obsta que se estén ensayando nuevos métodos. Como sustrato se recurre al azúcar bruto (procedente de caña de azúcar o de melazas de remolacha) y al almidón (de maíz, trigo, cebada o yuca), convertido en azúcar. Aunque se ha venido aprovechando la capacidad fermentadora de una levadura, quizá resulten más eficientes las bacterias *Zymomonas mobilis* y *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Si consideramos que los precios del azúcar bruto y del almidón fluctúan bastante, sería difícil basar una gran industria de fermentación en tales sustratos. Por no recordar, además, que se trata de sustancias necesarias para la dieta. De las estrategias a seguir hay tres que se apoyan en la celulosa y en polímeros relacionados de la madera; una y otros son abundantes, renovables y baratos. La celulosa puede ser fermentada en un solo paso o en dos. En el proceso en dos pasos, un microorganismo degrada la celulosa en sus unidades del azúcar componente, que luego se fermentan por otro microorganismo dando etanol. En el proceso de una sola fase, un único microorganismo degrada la celulosa y fermenta el azúcar resultante, produciendo etanol. Los microorganismos que poseen esta capacidad son raros. De ahí la necesidad de pensar en una cuarta estrategia: programar una levadura o una bacteria, que conviertan la celulosa en etanol, en una sola operación.

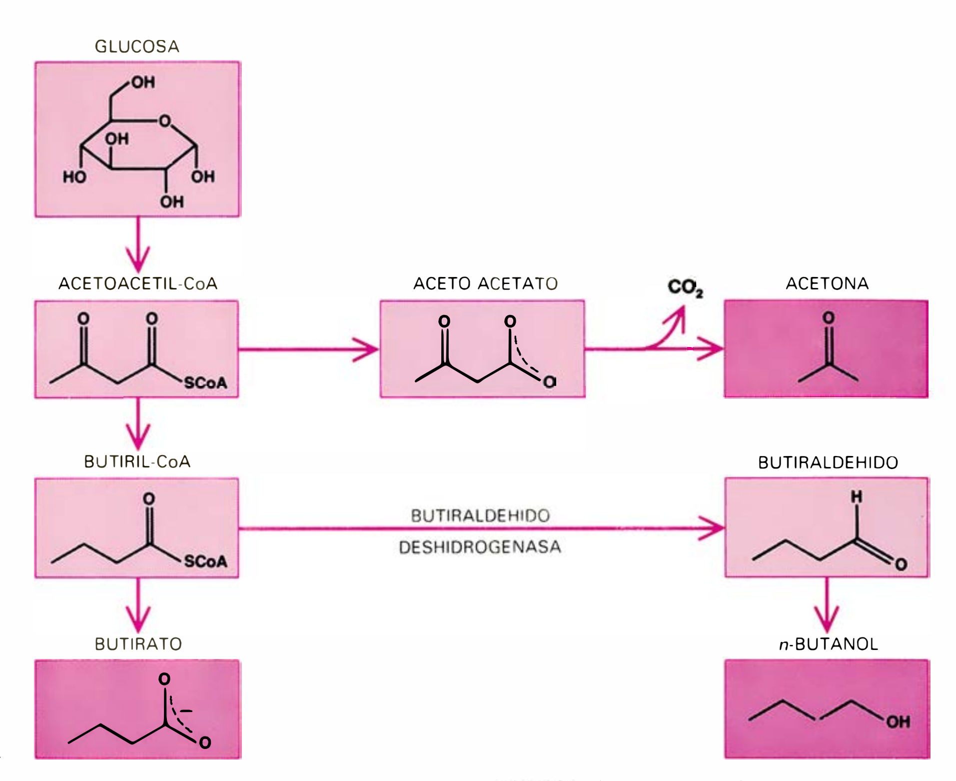
ventaja sobre los microorganismos que crecen a temperaturas más bajas radica en su metabolismo más rápido. Ni precisan una intensa refrigeración del tanque de fermentación al objeto de eliminar el calor desprendido por el metabolismo bacteriano. Además, cuando la corriente de disolvente sale del tanque a temperatura elevada, se necesita menos energía para la subsiguiente purificación del producto por destilación.

Habrá que preparar sustratos abundantes y baratos, si la producción microbiológica de solventes ha de competir con la síntesis química a partir de derivados del petróleo. En los primitivos métodos para preparar solventes por fermentación, el sustrato era azúcar de caña, de melaza de remolacha o almidón de maíz, trigo, centeno o yuca. El precio del azúcar de caña, de las melazas y del almidón está sometido a amplias fluctuaciones y, por ello, será difícil basar una gran industria de fermentación en estos sustratos. Por si fuera poco, se trata de materiales destinados al consumo. De ahí que se esté prestando atención a otros sustratos alternativos: celulosa, metanol y residuos orgánicos.

La celulosa y polímeros relacionados son uno de los principales constituyentes de casi todos los materiales vegetales. Nos hallamos, pues, ante un recurso renovable. Fuente prometedora de celulosa para la producción de disolventes es la madera. Abunda y tiene un precio bajo y estable, en comparación con el del azúcar o el almidón. La madera posee tres componentes estructurales: lignina, celulosa y hemicelulosa, polisacáridos los dos últimos. Para que la fermentación de la madera compita con la industria de los productos químicos sintéticos, deben aprovecharse los tres componentes. La lignina no presenta ningún problema: puede arder como combustible altamente calórico. Deben desarrollarse, sin embargo, métodos eficientes para la fermentación de la celulosa y la hemicelulosa. De ellos me ocuparé más tarde, cuando aborde la producción de metanol.

El metanol, otro sustrato a la espera, puede fabricarse a partir del carbón convertido en gas de síntesis. El metanol tiene un solo carbono; se requieren sutiles rutas bioquímicas para su conversión en moléculas más complejas, en las que los átomos de carbono están ligados entre sí. Son contados los microorganismos capaces de obtener todo su carbono a partir de compuestos de un solo átomo de carbono, tales como el metanol; por tanto, cualquier proceso comercial basado en un sustrato del tipo del metanol habrá de apoyarse en uno de esos organismos. En cuyo genoma deberá programarse genéticamente los mecanismos reguladores y las rutas bioquímicas apropiadas. Chemical Industries, de Gran Bretaña, ha cultivado la bacteria *Methylophilus methylotrophus* sobre metanol, habiendo eliminado primero una ruta dependiente de energía por métodos de ingeniería genética. La bacteria produce una proteína unicelular que se vende como pienso con el nombre de Pruteen.

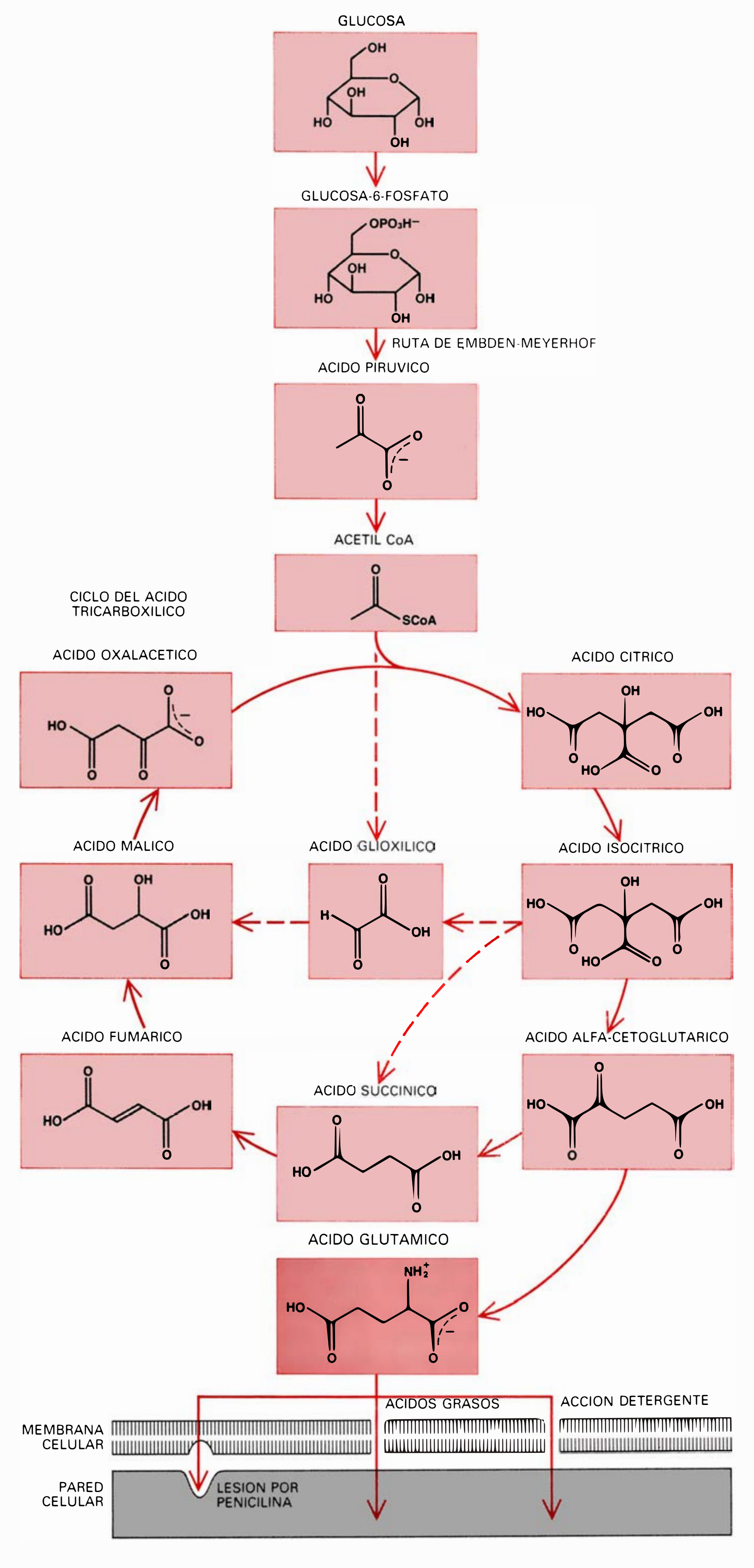
El aprovechamiento de desechos orgánicos como sustrato para la producción de disolventes podría gozar de la ventaja adicional de sacarle partido a materiales nocivos. Los residuos son mezclas complejas de sustancias, algunas de ellas tóxicas. Para fermentar tales desechos, debe encontrarse un microorganismo que sea resistente a cualquiera de las toxinas presentes y capaz de consumir varias de las sustancias componentes de la mezcla. Una familia bacteriana que aparece como un candidato ideal es la que engloba las pseudomonas. Ananda M. Chakrabarty, de la General Electric Company, ha obtenido, vía programación genética, una cepa de *Pseudomonas putida* que metaboliza naftaleno, xileno, alcanos y alcanfor. La sugerencia de que la bacteria podría degradar las manchas de petróleo vertidas al océano es exagerar sus posibilidades, pero puede resultar útil en algunos asentamientos industriales, en depósitos de depuración de residuos por ejemplo, donde pueden controlarse la temperatura y otros factores ambientales.



SINTESIS DE *N*-BUTANOL realizable por métodos microbiológicos. (La *n* significa que la molécula es una cadena lineal de átomos de carbono.) La verdad es que no se han adoptado esas estrategias porque no se conocen bien las rutas bioquímicas. Las rutas que se muestran aquí representan la fermentación de la glucosa, para dar *n*-butanol, por la bacteria *Clostridium acetobutylicum*. Se forma butirato (la sal del ácido butírico), seguida de un nuevo recorrido de la ruta metabólica para la producción de acetona y de *n*-butanol. Se desconoce el mecanismo que lo controla. Otro factor crítico es la toxicidad del *n*-butanol.

Pasemos al etanol. Se trata de uno de los productos químicos orgánicos más importantes de la industria. Estados Unidos produjo 619.000 toneladas, con un valor de ventas de 297 millones de dólares, a lo largo de 1980. (Estas cifras no incluyen el etanol destinado a la fabricación de bebidas alcohólicas.) El etanol se emplea como disolvente, como extractor y como anticongelante. Sirve de sustrato, además, para la síntesis de otros compuestos orgánicos con función disolvente, extractora, colorante, farmacéutica, lubricante, adhesiva, detergente, pesticida, plastificante, de recubrimiento superficial y cosmética, o compuestos que se utilizan como explosivos y resinas para la fabricación de fibras sintéticas.

El etanol puede fabricarse por síntesis a partir de materiales petroquímicos o por fermentación biológica en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* u otros microorganismos. En un proceso químico común, el etileno derivado del petróleo o del gas natural se convierte, a temperatura elevada, en etanol mediante la adición de agua y en presencia de ciertos catalizadores. En el proceso



microbiológico, una levadura excreta etanol como uno de los productos secundarios de la fermentación, bien sea de azúcar crudo o de almidón que ha sido convertido en azúcar. A comienzos del siglo XX se asistió a una gran producción de etanol por fermentación. En los últimos años, el 70 por ciento del etanol fabricado en los Estados Unidos lo fue por síntesis química, condicionado, sobre todo, por el coste del azúcar y del almidón. Pero la subida incesante del precio del petróleo está empujando de nuevo la industria hacia la fermentación.

La balanza de los precios ha variado tanto que la fabricación del etanol por fermentación constituye hoy una alternativa firme a la carestía de la gasolina. Brasil espera reemplazar la gasolina por etanol, para la década de 1990. La aparición del gasohol, una mezcla 9:1 de gasolina y alcohol, ha sido recibida con entusiasmo en el Medio Oeste. Sustituir la gasolina por el gasohol, a través de todo el país, va a requerir al menos 12.000 millones de galones de etanol por año (1 galón norteamericano equivale a 3,785 litros); la producción se cifra hoy en los 300 millones de galones, de los cuales una tercera parte se consume como combustible. Pero el precio del etanol producido por fermentación resiste la comparación con el precio de la gasolina.

Si el etanol ha de servir como combustible, se necesita de forma apre-

PRODUCCION DE UN AMINOACIDO por métodos biológicos. Su obtención depende de las estrategias seguidas para alterar el metabolismo celular y promover la excrección del producto por parte de la célula. Aquí se muestra la conversión de glucosa en ácido glutámico (o la sal MSG), por *Corynebacterium*. La glucosa se convierte en piruvato a través de la ruta de Embden-Meyerhof (glucolisis), un mecanismo fundamental mediante el cual la célula obtiene energía a partir de glucosa. El piruvato entra luego en el ciclo de Krebs, o ciclo del ácido tricarboxílico, en el que una posterior oxidación libera más energía. El ciclo forma cortocircuitos debido a un bajo nivel del enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, que promueve la conversión del ácido cetoglutárico en ácido succínico, y por un elevado nivel del enzima glutamato deshidrogenasa, que anima la conversión del ácido alfa-cetoglutárico en ácido glutámico. Al mismo tiempo, el ciclo del glioxilato, representado en la ilustración por las flechas de trazo discontinuo, es activado para que produzca más energía. Mientras que la célula está creciendo, el ciclo del glioxilato compite por el ácido alfa-cetoglutárico con la ruta del ácido glutámico. En un momento dado, todo el sustrato es desviado a ácido glutámico. Existen varias estrategias para inducir a la célula a que excrete glutamato en grandes cantidades. Si se priva a la célula de la vitamina biotina, la membrana desarrolla fugas, que permiten que pase más glutamato a través de ellas. La membrana puede modificarse eficazmente, añadiendo al medio de crecimiento un ácido graso saturado o un detergente. La adición de penicilina al medio de cultivo daña la pared celular, a través de cuyos puntos de lesión pueden excretarse grandes cantidades de ácido glutámico.

miante un sustrato abundante y barato. En una plétora de cereales, como la que conoce hoy el campo norteamericano, el grano excedente podría servir de sustrato, pero proporcionaría, como máximo, unos 2000 millones de galones de etanol al año.

Otro sustrato más abundante es la madera. Pero la síntesis biológica del etanol a partir de la madera resulta mucho más complicada que a partir del grano. La madera debe sufrir varios tratamientos previos, y hay que separar su celulosa y hemicelulosa. La celulosa se fermenta, luego, en dos pasos o en uno solo. En el proceso de dos etapas, por tratarse de un polímero de glucosa, la celulosa se degrada en sus unidades componentes de azúcar, que se fermentan para dar etanol. Aunque es un proceso eficiente, su naturaleza compuesta encarece los costes. La otra alternativa consiste en romper la celulosa y fermentar el azúcar resultante, en la misma operación. Ahora bien, los microorganismos que portan la dotación completa de enzimas necesarios para llevar a cabo esta transformación son raros, a lo que parece. De ahí que la investigación actual se centre en cómo programar genéticamente una levadura productora de etanol, o la bacteria *Zymomonas*, que permita degradar la celulosa.

Ensayos semejantes se están llevando a cabo a propósito de la hemicelulosa xilano, un polisacárido que posee una estructura algo diferente de la de la celulosa. Está compuesta del azúcar pentosa xilosa. El xilano puede constituir hasta el 30 por ciento de la masa de la madera. Varios grupos de investigadores dirigidos por Henry Schneider, del National Research Council de Canadá, y George T. Tsao, de la Universidad de Purdue, han mostrado, cada uno por su lado, que si se convierte xilosa en xilulosa, la levadura podrá fermentarla para rendir etanol. Al venir mediada la conversión de xilosa en xilulosa por el enzima xilosa isomerasa, muchos investigadores están tratando de incorporar, en el genoma de la levadura, el gen para la xilosa isomerasa.

¿Cuáles son los microorganismos que producen más etanol? Si nos fijamos en el camino escogido por la tradición habría que responder sin titubeo que las levaduras. Pero investigadores de la Universidad de New South Wales y de la Universidad de Rutgers han descubierto que la bacteria *Zymomonas mobilis*, que se encuentra en vinos de palma y en la bebida mexicana pulque, fermenta el azúcar dos veces más deprisa que lo hace la levadura. En último término, las bacterias termófilas podrían convertirse en las fermentadoras más eficientes. Además, su rendimiento puede potenciarse merced a las técnicas de ADN recombinante, que incrementarían la cantidad de ciertos enzimas en la célula o reemplazarían un enzima por otro, dotado aquel de mayor actividad específica.

Una de las principales limitaciones con que topa la producción por fermentación de etanol y de otros disolventes es la capacidad del microorganismo para tolerar el disolvente. No es mucho lo que se sabe acerca de qué sea lo que hace, a un microorganismo, resistente al etanol; parece, sin embargo, que la tolerancia se halla ligada a la fracción de los ácidos grasos que hay en la membrana de la célula, químicamente insaturados o deficientes en hidrógeno. Quizá valga de explicación recordar que los ácidos grasos no saturados hacen a la membrana más permeable al etanol y reducen, por tanto, su concentración intracelular.

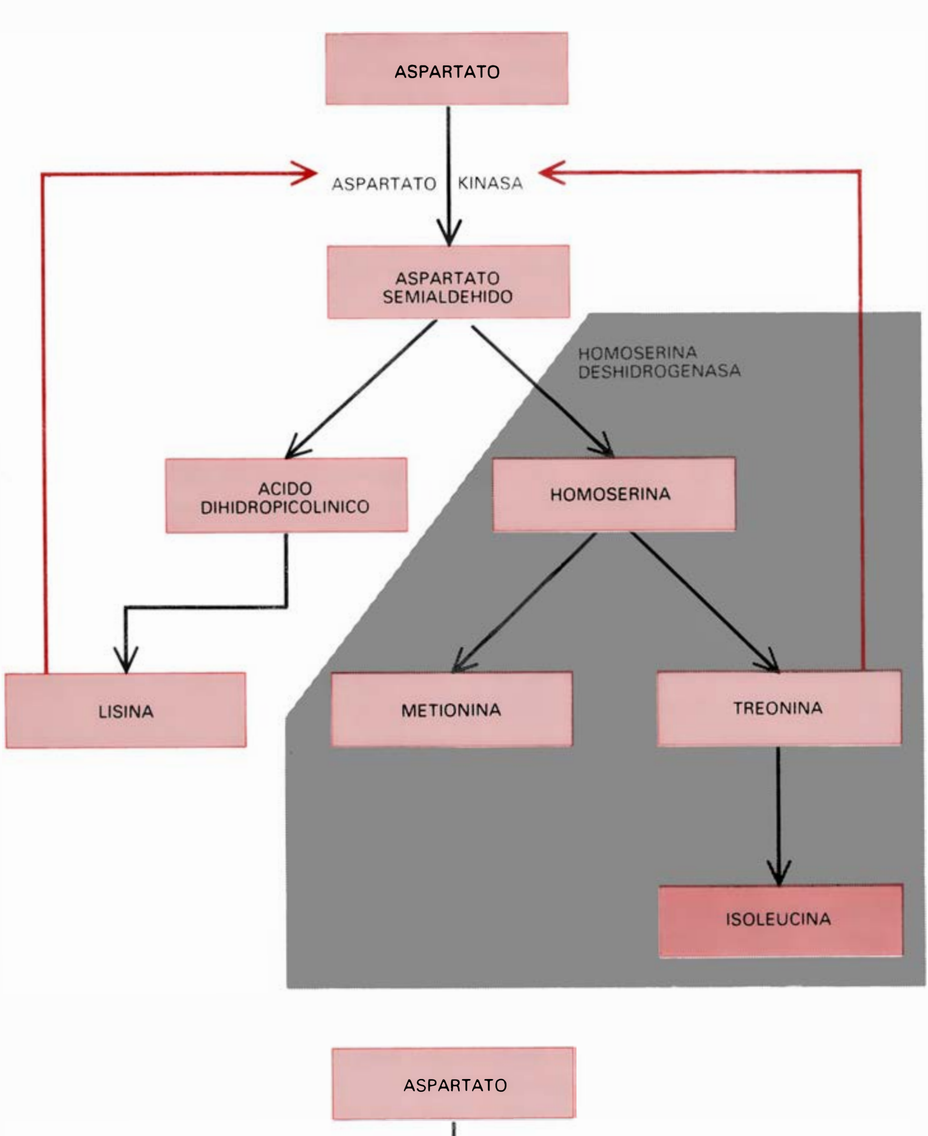
Otro disolvente orgánico es el *n*-butanol (la *n*, abreviatura de "normal", significa que la molécula es una cadena lineal recta de átomos de carbono, y no una cadena ramificada). Se emplea ampliamente en la fabricación de plastificantes, líquido para frenos, aditivos para la gasolina, resinas de urea-formaldehído, extractores y cubiertas protectoras. Podríamos decir que todo el *n*-butanol que se expende hoy se produce por síntesis química. Desde hace mucho, empero, se conoce una ruta biológica. En 1912 Chaim Weizmann, a la sazón en la Universidad de Manchester, desarrolló un cultivo bacteriano para la producción de *n*-butanol, a partir del que sintetizó butadieno para fabricar goma sintética. Un producto secundario de la fermentación es la acetona, de la que hubo una gran demanda como disolvente durante la primera guerra mundial para la fabricación del explosivo cordita. Terminado el conflicto, bajó la demanda de acetona, y aumentó, por contra, la exigencia de *n*-butanol.

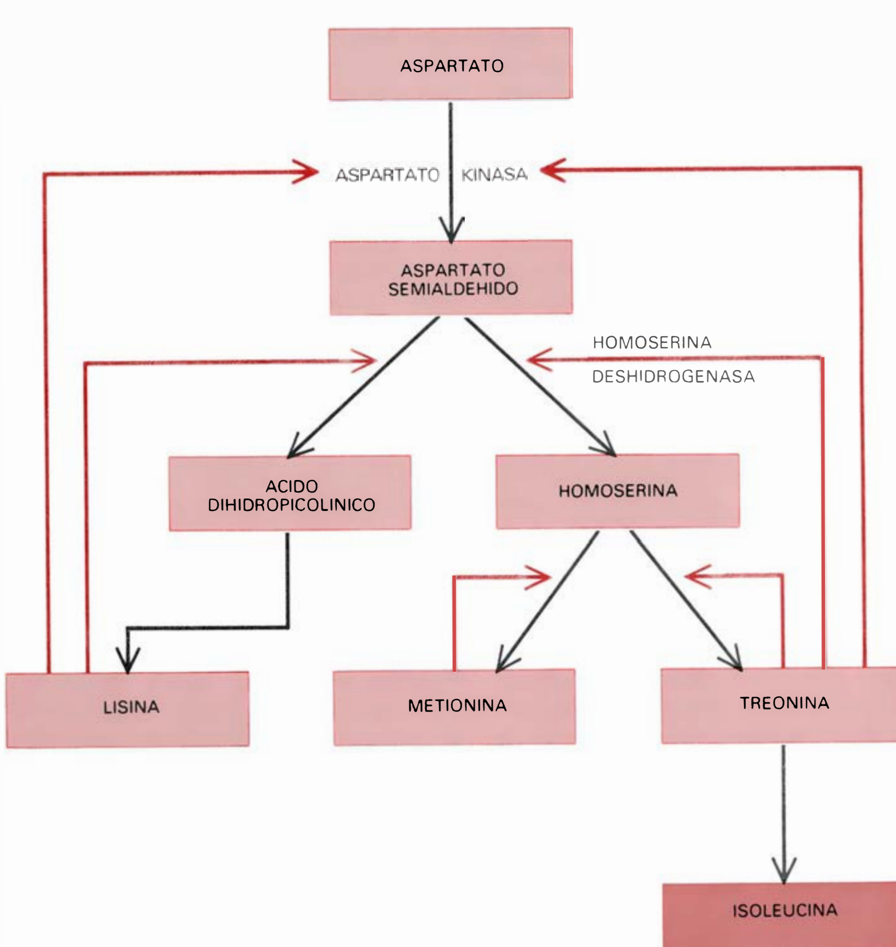
La fermentación diseñada por Weizmann se fundaba en la conversión del almidón por la bacteria *Clostridium acetobutylicum* o en la conversión del azúcar por *Clostridium saccharoacetobutylicum*. La producción de *n*-butanol por fermentación decayó a lo largo de la década de 1940 y de 1950, debido, sobre todo, a que el precio de los productos petroquímicos se situó por debajo del precio del almidón y de sustratos azucarados, tales como el maíz o las melazas. Hoy, la producción de *n*-butanol por fermentación sólo se practica en Africa del Sur, donde el petróleo escasea por mor del embargo internacional. El sustrato son melazas; se requiere también carbón como fuente de energía. Las bacterias utilizadas se recuperan y se venden luego como pienso para rumiantes. Ante la escalada que registra el precio de los productos petroquímicos, la industria de otros países se está planteando de nuevo la viabilidad de la fermentación como fuente de *n*-butanol.

Mas la adopción de métodos microbiológicos en gran escala, aplicados a la síntesis de *n*-butanol, se enfrenta con una muralla difícil de obviar: nuestros escasos conocimientos acerca de las rutas metabólicas implicadas. Otro factor crítico es la naturaleza del *n*-butanol, tóxica para la bacteria. Las primeras cepas industriales de *C. acetobutylicum* fermentaban como máximo el 3,8 por ciento del almidón sustrato, para dar un 1,2 por ciento de *n*-butanol. Las bacterias mueren ante concentraciones más elevadas de este producto que ha resultado de su propio metabolismo. A los investigadores no les ha acompañado la suerte a la hora de seleccionar cepas mutantes con mayor tolerancia al *n*-butanol. En las evaluaciones de laboratorio se ha logrado una tolerancia de 2,85 por ciento, añadiendo carbón activo al medio de fermentación; pero no se sabe si esto podrá hacerse a gran escala. Una vez que se conozca por qué una sustancia deviene tóxica para un organismo, las técnicas del ADN recombinante podrán sugerir una estrategia para incrementar la resistencia del organismo.

El glicerol sirve de lubricante en la fabricación de alimentos para animales domésticos, productos cocinados, confituras, helados, pasta de dientes, adhesivos, goma, planchas de corcho, celofán y ciertas clases de papel. Como emoliente y demulgente aparecen entre los ingredientes de muchos productos farmacéuticos y cosméticos. Como disolvente se ha añadido a extractos aromatizantes y colorantes destinados a la alimentación. Los ésteres de glicerol figuran en la fabricación de explosivos y propulsores.

Le toca el turno ahora al glicerol. Durante la primera guerra mundial, Alemania fabricó grandes cantidades de glicerol, vía fermentación, para su uso en explosivos. El proceso consistía en añadir sulfito sódico a un cultivo de fermentación de etanol. El sulfito obstruye la síntesis de etanol al combinarse con una molécula intermediaria. Con la desviación resultante de la ruta metabólica, el glicerol se convierte en el





principal producto final. Desde esa conflagración bélica, no se ha fabricado glicerol por fermentación a escala industrial; sí, empero, saponificando grasas y por síntesis a partir del propileno y del propano. Se ha vuelto la mirada hacia la producción microbiana de glicerol a raíz, sobre todo, del descubrimiento de levaduras que pueden sintetizarlo sin necesidad de sulfito sódico o de otros agentes.

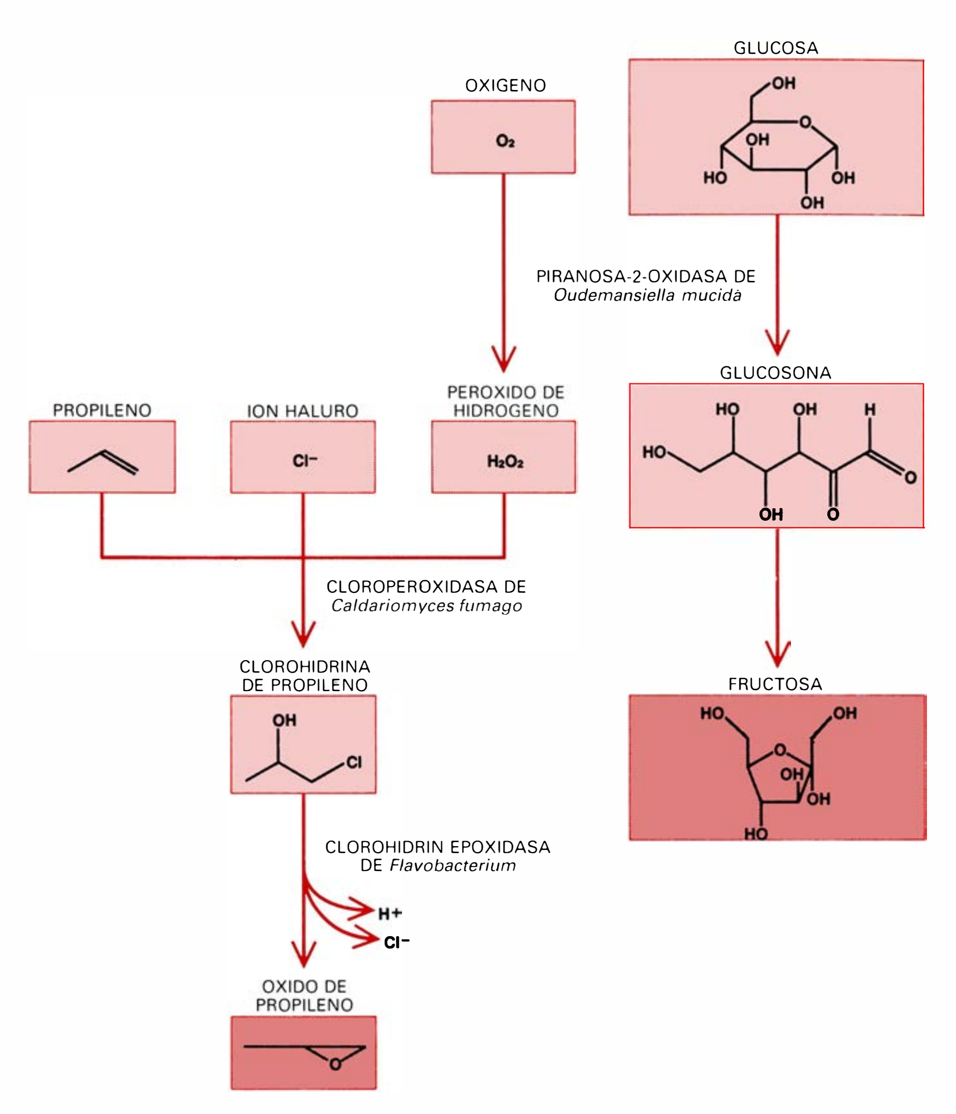
De los ácidos orgánicos industriales, el ácido acético es el más importante. En los Estados Unidos se producen anualmente más de 1,4 millones de toneladas, con un valor de 500 millones de dólares. (Se excluye de estas cantidades el ácido acético que se utiliza como vinagre.) El ácido se aplica también en la fabricación de goma, plásticos, fibras de acetato, productos farmacéuticos, colorantes, insecticidas y materiales fotográficos. En Japón, el ácido acético constituye un sustrato para la producción, por fermentación, de aminoácidos.

Por oxidación microbiológica del etanol puede formarse ácido acético; ahora bien, salvo en la fabricación de vinagre, el proceso no suele ser, en general, competitivo con la síntesis química, que se basa en la carbonilación del metano. En Estados Unidos se están realizando trabajos prometedores sobre la fermentación de la celulosa, para dar ácido acético, por una bacteria termófila. Otra posible manera de abordarlo es la conversión de hidrógeno y de dióxido de carbono en ácido acético por las bacterias *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum*. El desarrollo de semejante tecnología dependerá del desciframiento de la genética de estas bacterias, tan poco estudiadas.

INHIBICION POR RETROALIMENTACION: un mecanismo regulador intracelular, que puede obviarse en la producción comercial de ciertos aminoácidos, la lisina entre ellos. El diagrama superior muestra la ruta metabólica para la producción por fermentación de lisina por *Corynebacterium glutamicum*. Las líneas coloreadas representan la inhibición por retroalimentación. Tanto la lisina como la treonina son fabricadas por la bacteria; su acumulación simultánea inhibe la acción del primer enzima de la ruta, la aspartato kinasa; inhibe, por ende, la posterior producción de lisina. En una cepa mutante, que carece del enzima homoserina deshidrogenasa, los pasos metabólicos que conducen a la síntesis de treonina están eliminados; los pasos que faltan se hallan en el interior de la región gris. El mutante necesita treonina para desarrollarse, pero ésta se va añadiendo lentamente, al objeto de que ni la treonina ni la lisina acumuladas hagan que se dispare la inhibición por retroalimentación. En ausencia del mecanismo inhibidor, se sintetiza lisina a pleno rendimiento. El diagrama inferior muestra las rutas metabólicas de la producción de lisina por *E. coli*. El mecanismo de inhibición por retroalimentación es más complejo (*líneas de color*), razón por la cual no se utiliza *Escherichia coli* para la fabricación de lisina.

El ácido cítrico, un ingrediente esencial en alimentos, lo producen con un rendimiento satisfactorio *Aspergillus niger* a partir de melazas. El mercado mundial de ácido cítrico es de 175.000 millones de toneladas por año, que representan una venta por valor de 259 millones de dólares. La fermentación resultaría más económica si se fundara en un sustrato menos caro, en la celulosa por ejemplo. Lo que podría lograrse transfiriendo, a *A. niger*, genes para los enzimas que degradan la celulosa. La producción comercial por fermentación de ciertos ácidos orgánicos, tales como el ácido acrílico, que se usa en los plásticos, y de N-acetil-*p*-aminofenol, que se vende en el mercado como un sustituto de la aspirina con el nombre de Tylenol, no se beneficiará tanto de la programación genética cuanto de un conocimiento más hondo de los mecanismos reguladores que favorecen su síntesis.

El ácido láctico, que sirve de acidulante en alimentos y de mordiente en tejidos y que se emplea en el plateado eléctrico, en el pulido eléctrico y en la fabricación de plásticos, fue el primer ácido orgánico que se fabricó, a escala industrial, por fermentación. En Estados Unidos y en Europa se comercializan unas 40.000 toneladas al año, por valor de 56 millones de dólares. Podríamos decir que todo el ácido láctico producido en Estados Unidos se fabrica ahora por síntesis química; en Europa, sin embargo, sólo la mitad del mismo se produce por esa vía. Por fermentación a partir de la glucosa, la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* rinde ácido láctico. Si bien la recuperación del ácido a partir del cultivo resulta cara.



SINTESIS ENZIMATICA DE OXIDOS DE ALQUENOS, que son materias primas para la industria de los plásticos. Debemos su proposición a Saul L. Neidleman, de la Cetus Corporation norteamericana. Plásticos como el polipropileno y el polietileno se fabrican mediante la polimerización de óxidos de alquenos, que se obtienen a partir de productos petroquímicos. La síntesis de origen biológico se basa en tres enzimas: piranosa-2-oxidasa, una haloperoxidasa y una epoxidasa. Las fuentes fúngicas y bacterianas de los enzimas están indicadas en el diagrama. El sistema puede generar valiosos productos secundarios.

¿Qué ocurre con los aminoácidos, esas pequeñas moléculas que se ensamblan para formar proteínas? De los 20 aminoácidos que hallamos normalmente incorporados en las proteínas, ocho no los puede sintetizar el hombre; entre estos ocho aminoácidos esenciales, la lisina y la metionina revisten particular importancia para la nutrición, porque la mayoría de los cereales son deficientes en ellos. De ahí la explotación comercial de lisina y metionina como aditivos para piensos animales. La metionina se fabrica por síntesis. Pero sólo el 20 por ciento de la lisina producida se elabora por esta vía; el 80 por ciento restante lo es por fermentación. Otro aminoácido de interés industrial es el ácido glutámico, que bajo la forma de una sal, el glutamato monosódico (MSG), se utiliza para exaltar el aroma. Sólo se fabrica por métodos microbiológicos. La producción por fermentación de 40.000 toneladas de lisina al año y de otras tantas 300.000 toneladas anuales de MGS constituye un hito en la producción microbiológica de productos químicos industriales.

En términos generales, la fermentación rinde más que la síntesis química a la hora de fabricar aminoácidos, siempre que se conozcan las rutas metabólicas de la célula que gobiernan su producción y que no sean demasiado complejas. Cada aminoácido posee dos isómeros, o imágenes especulares de la distribución de la molécula. Salvo contadas excepciones, sólo uno de los isómeros participa en las reacciones biológicas. La producción microbiológica de un aminoácido suministra el isómero biológicamente activo, en tanto que la síntesis química rinde igual proporción de cada una de las dos disposiciones espaciales. Los métodos para separar los isómeros son, además, caros y, en algunos casos, ni siquiera se conocen. Cabe esperar que a medida que vayamos ahondando en el conocimiento del metabolismo celular, todos los aminoácidos de valor comercial se fabricarán únicamente por fermentación.

El MSG es producido en gran escala por *Corynebacterium glutamicum* y por *Brevibacterium flavum*. En Estados Unidos, la industria de los aromatizantes consume, cada año, 30.000 toneladas de MSG; un tercio de esta cantidad se importa de Japón y de Corea del Sur. Su principal sustrato es la glucosa y como alternativa figuran las fracciones *n*-parafínicas del petróleo, que se emplearon en los últimos años de la década 1960 cuando las había en gran abundancia y a coste bajo, y el ácido acético, que tampoco es caro y origina menos productos de desecho que la glucosa.

Observamos un punto importante en la producción comercial de MSG (y otros aminoácidos). Nos referimos al hecho de poder inducir en la célula la

orden de secretarlo en grandes cantidades. Una estrategia adoptada para este fin consiste en cultivar *Corynebacterium glutamicum* en un medio donde exista vitamina biotina en cantidad inferior a la óptima. La membrana celular se hace entonces deficiente en fosfolípidos, lo que ocasiona fugas que permiten una mayor secreción de MSG. Si el medio de crecimiento tiene un elevado nivel de biotina, se deberá alterar la membrana de otra manera, piénsese por ejemplo en añadir un ácido graso saturado o un detergente. Vale también agregar penicilina, cuyo comportamiento antibacteriano se manifiesta en la inhibición del peptidoglicano de la pared celular.

En cuanto se revelen los mecanismos que gobiernan la excreción del MSG, se podrán aplicar técnicas del ADN recombinante al *C. glutamicum* con el fin de crear membranas con fugas. Tales cepas genéticamente alteradas proporcionarán elevados niveles de MSG, sin un requerimiento para la regulación precisa de las condiciones de crecimiento y sin necesidad de aditivos caros, tales como ácidos grasos saturados, detergentes o penicilinas.

El rendimiento de un aminoácido puede incrementarse, también, a través del desarrollo de una cepa bacteriana donde se obvíe el mecanismo regulador que ordinariamente limita la producción del aminoácido en cuestión. En *C. glutamicum*, por ejemplo, la lisina y la treonina son, ambas, productos de la misma secuencia de acontecimientos sintéticos; la presencia simultánea de esos dos aminoácidos inhibe un paso enzimático al comienzo de la ruta e impide así la producción posterior de lisina. En una cierta cepa mutante, los pasos que conducen a la síntesis de treonina están bloqueados. Las bacterias mutantes necesitan treonina para desarrollarse, pero se la va incorporando poco a poco de forma que ésta y la lisina acumulada no inhiban la producción subsiguiente de lisina. Una vez a salvo de la regulación, se sintetiza lisina a pleno rendimiento. En otra manera de abordar el tema no se bloquea ningún paso, sino que se inutiliza el propio mecanismo de inhibición por retroalimentación, dejándose vía libre a la acumulación de lisina y de treonina.

La industria de los aminoácidos ofrece un brillante panorama con nuevos mercados y expansión de los establecidos. La demanda mundial de proteína animal es elevada, y, por ende, la exigencia de lisina y metionina como suplemento de piensos. La Eurolysine de Amiens, Francia, invirtió hace poco 27 millones de dólares para duplicar su producción de lisina. Se ha extendido el uso de los aminoácidos glicocola y alanina como agentes aromatizantes y el de la cisteína para dar textura al pan. Se ha sugerido, asimismo, que las úlceras gástricas se traten con los aminoácidos glutamina e histidina y que en los trastornos hepáticos se recurra a la arginina.

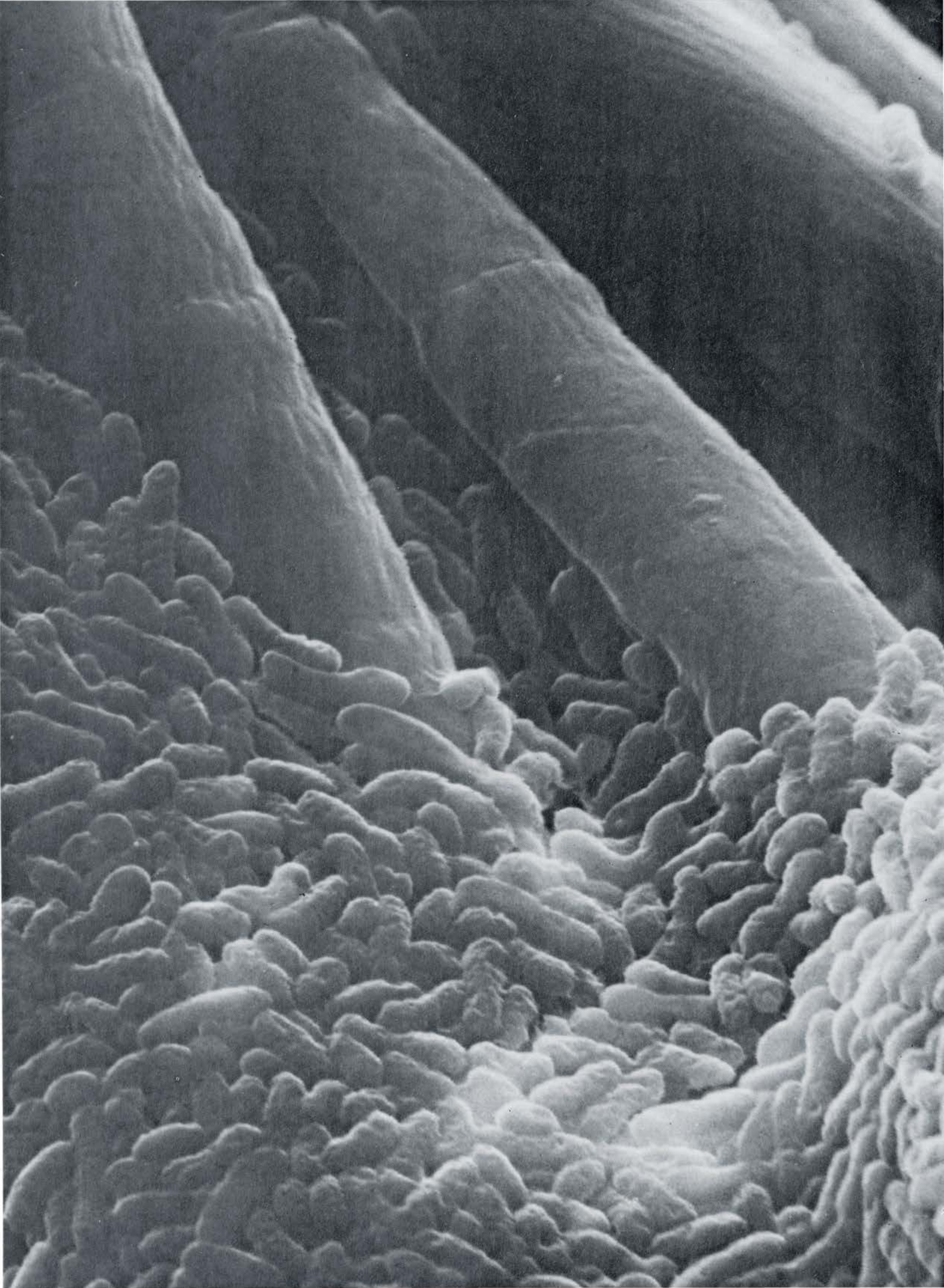
¿Cómo responderá la industria de la fermentación a esa demanda creciente? Cabe presumir una producción comercial extendida a otros aminoácidos y una mejora en el rendimiento merced a la aplicación de técnicas de ADN recombinante que permitan orillar los mecanismos reguladores intracelulares. Allí donde los mecanismos reguladores son demasiado complejos como para salvarlos, puede fabricarse por fermentación un precursor del aminoácido y luego transformarlo enzimáticamente.

A buen seguro, la contribución más significativa de la ingeniería genética a la síntesis de aminoácidos será viabilizar la fabricación, por fermentación, de metionina; hoy se producen, por síntesis química, 105.000 toneladas anuales. La síntesis biológica ha constituido siempre el sueño de los bioingenieros, pero todavía no se han diseñado, vía mutación y selección, microorganismos que rindan grandes cantidades de metionina. ¿Por qué ese fracaso? Porque sólo se podrían aprovechar las rutas bioquímicas existentes. Es de esperar que las técnicas del ADN recombinante permitan introducir las nuevas rutas necesarias, así como mecanismos reguladores.

De cara a la producción comercial de metionina podría pensarse en la producción de una proteína que la poseyera en abundancia. Cuando la metionina se añade directamente a los piensos animales, éstos adquieren un sabor amargo. Si pudiera salvarse ese inconveniente, cabría añadir metionina a la dieta humana como suplemento nutricional. Una proteína que haya incorporado grandes cantidades de metionina es más agradable al paladar que la metionina sola.

La industria de síntesis de productos químicos cederá el paso a los métodos biológicos en la producción de todos los aminoácidos. Es sólo cuestión de tiempo. Las nuevas técnicas de programación genética harán envejecer y acabarán por arrinconar la "Oda del químico orgánico".

Señor, ante quien doblo mi rodilla,
te ruego que todas mis síntesis
no sean en adelante inferiores
a las realizadas por las bacterias.



Métodos de producción en microbiología industrial

La práctica tradicional se acopla a la escala en la que se fabrican la mayoría de los productos para facilitar la producción en lotes. La investigación actual, sin embargo, está apuntando su rumbo hacia otros métodos de operación continua

Elmer L. Gaden, Jr

En las aplicaciones de la microbiología a la industria el elemento más característico suele ser el factor biológico: la explotación de un organismo vivo para fabricar una sustancia útil. Como se expone en otra parte de este número de *Investigación y Ciencia*, los métodos de ingeniería genética prometen incrementar el rendimiento y versatilidad de los organismos de los que dependen tales industrias. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un proceso biológico sólo alcanza su completa utilidad cuando está adaptado a un contexto de producción. En un proceso de fermentación industrial, las materias primas tienen que entrar en contacto con las células vivas o con algún componente extraído de éstas (normalmente enzimas); deben mantenerse las condiciones ambientales que favorezcan las transformaciones bioquímicas de los materiales nutritivos en productos; con frecuencia los productos han de aislarse de otras sustancias con las que aparecen mezclados. Por tanto, la microbiología industrial requiere no sólo microorganismos, sino también un ambiente, donde los organismos puedan desarrollarse, y una tecnología para manejarlos, tanto a ellos como a sus productos. El ambiente y la tecnología suelen proporcionarlos un sistema de tanques, conducciones, bombas, válvulas y otros artificios. Se deduce, por consiguiente, que la ingeniería genética constituye sólo un factor en el éxito de una industria biológica; del mismo carácter esencial participa la contribución aportada por la ingeniería de procesos.

Para cualquier procedimiento bioquímico dado, hay muchas formas de organizar una planta a escala industrial. Hasta ahora, sin embargo, sólo se vienen practicando unas pocas; se pueden dividir en dos grandes categorías: procesos estáticos y procesos continuos. En un proceso estático, se colocan en un tanque los materiales de partida y los microorganismos. La conversión bioquímica tiene lugar en el recipiente, a lo largo de un período que puede oscilar desde unas pocas horas hasta varios días. Finalmente, se vacía el depósito, se purifica el producto y se inicia una nueva operación. En un proceso continuo, se suministran los materiales nutritivos y se separan los productos acabados, en un flujo constante. En este proceso, todas las etapas de la conversión bioquímica deben proceder simultánea y esencialmente a la misma velocidad. Podríamos comparar el proceso estático con el funcionamiento de una acería, en tanto que el proceso continuo se halla en más próxima analogía con el modo de hacer de una refinería de petróleo.

La elección entre los métodos estáticos y los continuos debe fundarse en razones económicas. En general, los métodos continuos son los más apropiados para un gran volumen de producción; a pesar de lo cual, la mayoría de los productos de microbiología industrial se obtienen, hasta la fecha, en cultivos estáticos. Las razones, que incluiré más adelante, tienen que ver, en parte, con la naturaleza biológica de los procesos y, en parte, con la escala a la que se practica el grueso de la microbiología industrial. Una y otra pueden continuar favoreciendo los métodos estáticos durante algún tiempo.

Como se muestra en los artículos precedentes, los procesos industriales llevados a cabo por los medios microbiológicos varían grandemente en sus detalles. Pero coinciden en las líneas maestras de su esquema general. Desde el punto de vista de los expertos, las etapas biológicas pueden conocerse casi siempre en términos de procesos químicos de catálisis. La transformación de un sustrato en el producto deseado es acelerada por la presencia de un catalizador y, por consiguiente, se favorece selectivamente sobre otras reacciones posibles.

De acuerdo con este esquema, un microorganismo constituye un catalizador de excepcional complejidad. Por ejemplo, la levadura empleada en la elaboración de la cerveza o el vino puede considerarse catalizador de la conversión de azúcares en etanol y dióxido de carbono. Por supuesto que los agentes reales de los cambios químicos son los enzimas sintetizados por el organismo, y, en algunos casos, el propio enzima sirve en lugar de la célula entera. En la industria cervecera esta práctica se halla bien asentada: un enzima aislado de la malta o de un moho degrada el almidón en moléculas de azúcar.

Pero lo habitual es que la transformación biológica del sustrato incluya

BACTERIAS INMOVILIZADAS sobre fibras de algodón, para fabricar un alcohol industrial (etanol). Esta microfotografía electrónica de barrido la realizó Carl E. Shively, de la Universidad de Alfred. Durante siglos, se han empleado en America Central bacterias de la especie *Zymomonas mobilis*, para la fabricación de bebidas fermentadas. Entre éstas, el pulque, que se obtiene por fermentación del jugo de la pita. Según parece ofrecen un rendimiento mucho mayor que las levaduras a la hora de convertir carbohidratos en etanol. Para hacer la microfotografía se entrelazaron las fibras de algodón sobre una malla de plástico como soporte y se inocularon, a continuación, las bacterias. Se encajó la malla en una cámara de vidrio horizontal que medía 560 milímetros de longitud. Por un extremo se introdujeron nutrientes, glucosa incluida; el medio consumido, que contenía etanol, fluyó por el otro extremo. Después de 15 días de proceso se tomó una muestra de las bacterias inmovilizadas. No acaba de quedar claro si las bacterias están enmarañadas entre las fibras o si permanecen unidas a ellas por fuerzas de atracción electrostática.

diversas reacciones químicas entrelazadas, cada una de ellas catalizada por un enzima distinto. En aquellos casos en los que el proceso biológico es la síntesis de una molécula compleja, tal como un antibiótico, o de una proteína, así la insulina, se requiere la presencia de sistemas completos de enzimas. No se ha conseguido aún que tales sistemas funcionen fuera de la célula viva. Por otra parte, cuando el producto es la célula misma, como en el cultivo de la levadura del pan, todos los enzimas que participan en el metabolismo celular pueden considerarse componentes del sistema catalítico.

Una característica distintiva de un catalizador biológico, peculiaridad que tiene una influencia fundamental en el diseño de una planta industrial, es su exigencia de un medio controlado con exacta precisión. También el catalizador inorgánico opera mejor en una combinación particular de temperatura, presión y otras condiciones físicas. Pero las limitaciones sobre el funcionamiento de un catalizador biológico son mucho más estrictas. No se permite que la temperatura y el *p*H varíen fuera de un estrecho margen. Por otro lado, cuando el catalizador biológico son células vivas, el medio donde la reacción tiene lugar debe proporcionar todos los nutrientes y otras sustancias necesarias para sostener el crecimiento.

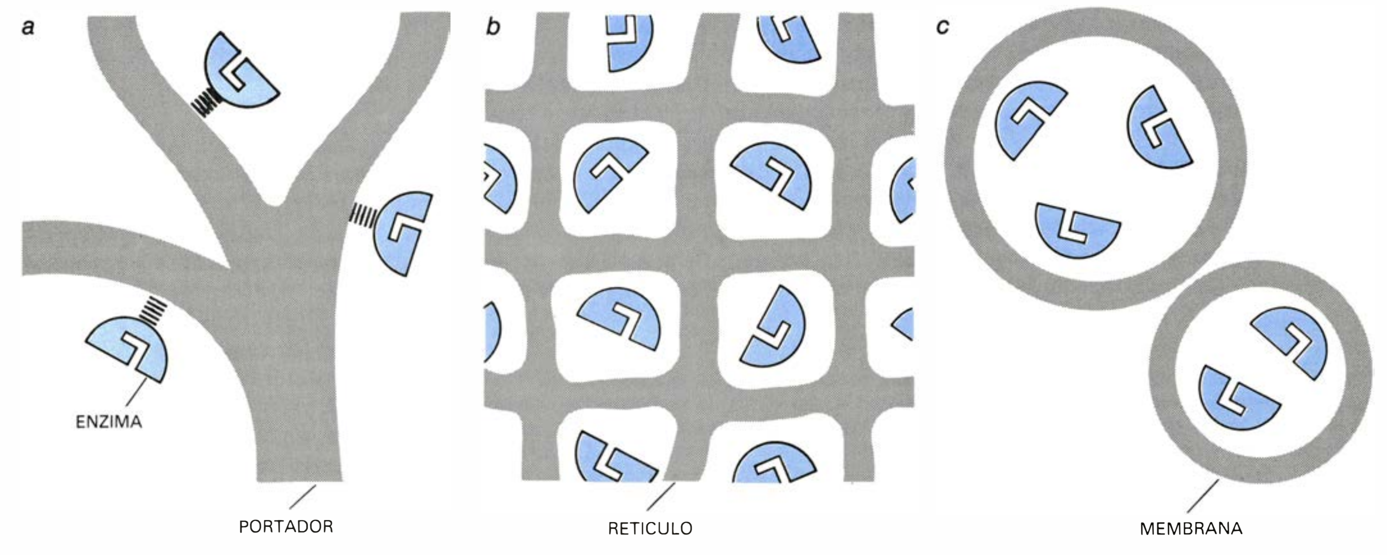
El medio sirve de reservorio para el sustrato y los nutrientes, y aporta el ambiente donde el sustrato y el catalizador interaccionan. El componente dominante del medio es casi siempre agua. También, en el caso en el que los microorganismos crecen sobre un sustrato sólido, cereales o forrajes por ejemplo, hay que humedecer el sustrato para permitir la acción microbiana o enzimática. Aunque algunos microorganismos y enzimas puedan mantenerse por secado cuidadoso, no ejercen actividad catalítica en ausencia de agua.

Además de proporcionar un ambiente acuoso útil, el medio debe satisfacer las necesidades nutritivas del microorganismo. Una necesidad primaria es la fuente de carbono, a quien corresponde, de ordinario, suministrar la energía para el metabolismo. En algunos casos, la fuente de carbono es también el sustrato de la reacción catalizada, como en la fermentación de azúcar para la obtención de etanol. Los hidratos de carbono (entre los que se cuentan el almidón y la glucosa) constituyen la fuente habitual de carbono. Sin embargo, en la década de los sesenta, ciertos hidrocarburos del petróleo y algunas grasas naturales, tales como aceite de soja, aparecieron como fuentes alternativas de carbono y energía. Muchos microorganismos de importancia industrial pueden vivir sobre tales materiales, aunque requieran a veces un período de adaptación. Más tarde, debido al alza de los cereales y al precio relativamente asequible del petróleo, interesaron sustratos alternativos. Pero los precios han cambiado radicalmente. De ahí que se esté prestando atención a la conversión de carbohidratos en hidrocarburos combustibles. Lo que no obsta que haya ciertas aplicaciones, muy pocas, en las que las fracciones del petróleo de difícil aprovechamiento para la fabricación de gasolinas sirvan de componentes en un proceso biológico.

La consideración dada a los sustratos hidrocarbonados ilustra bien la versatilidad de los microorganismos; debe señalarse que la tecnología que se utiliza con los microorganismos no siempre puede adaptarse con idéntica rapidez a los cambios. Hidrocarburos y grasas incorporan menos oxígeno que los carbohidratos y, por consiguiente, hay que cubrir esa deficiencia. Hasta tres veces más oxígeno puede llegar a ser necesario; el calor desprendido cuando se consume el sustrato es mayor en una proporción similar. Ocasión ha habido en que, al introducir grasas o petróleo como material nutritivo, los equipos disponibles no pudieron aportar el enfriamiento necesario.

Además del carbono, los nutrientes necesarios en cantidades sustanciales son nitrógeno y fósforo. Ambos elementos se incorporan en las moléculas estructurales y funcionales de las células. También forman parte de las moléculas del producto. Otros nutrientes, tales como vitaminas e iones metálicos, se requieren en menor cantidad. De nuevo alguno de estos "micronutrientes" aparecen integrados en las moléculas producto. Por ejemplo, en la fabricación de cobalamina o vitamina B_{12} se debe asegurar una fuente de cobalto, porque cada molécula de la vitamina incorpora un átomo de cobalto.

El oxígeno es otro elemento cuyo suministro reviste especial importancia. Algunos organismos fermentativos son estrictamente anaerobios; ello vale decir que hay que excluir el oxígeno de su ambiente. Por el contrario, cuando el oxígeno es necesario para el metabolismo la exigencia es perentoria. La fuente usual de suministro es aire filtrado; pero con el reciente incremento en el

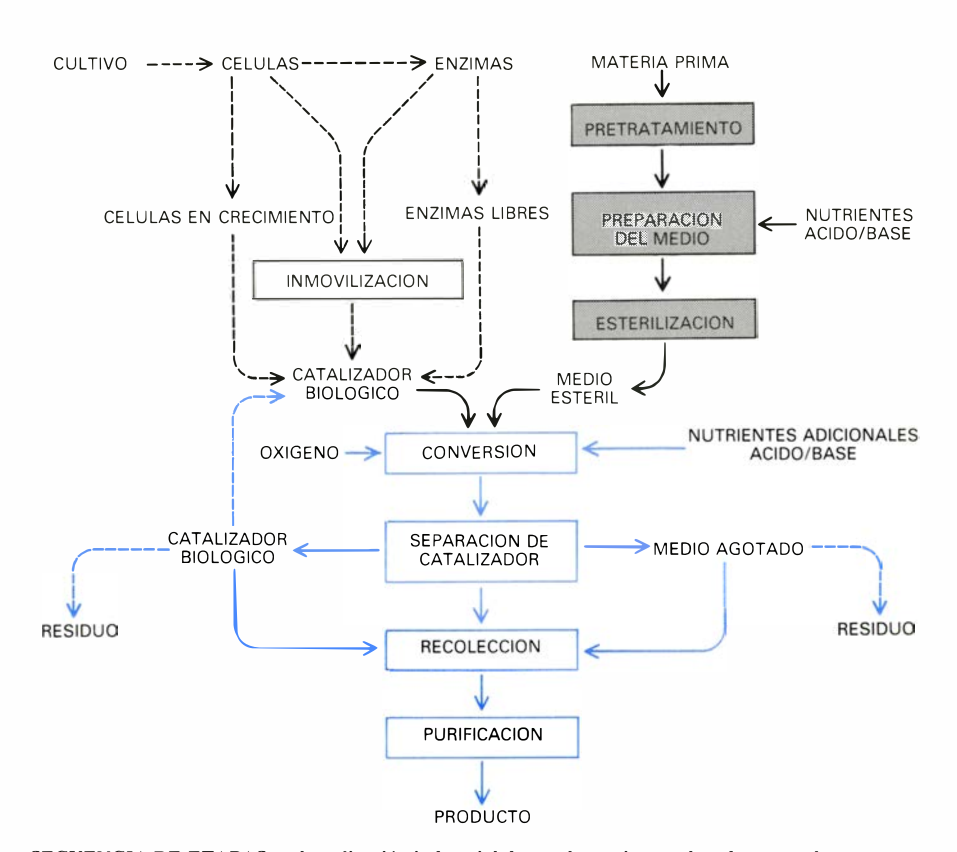


ENZIMA INMOVILIZADO para su empleo, por largo tiempo, como catalizador en un tanque reactor en cualquiera de los diversos métodos. Las moléculas del enzima pueden estar fijadas por adsorción o por unión química a un portador sólido tal como celulosa (*a*), pueden ser atrapadas por el retículo formado por un polímero permeable, así gel de sílice (*b*), o atrapadas en cápsulas esféricas hechas de membranas semipermeables de polímero (*c*).

precio de la electricidad se ha encarecido muchísimo el costo del bombeo de grandes volúmenes de aire. El fraccionamiento criogénico de aire en sus gases componentes ofrece una posible solución a ese nuevo problema. El empleo de aire enriquecido, que tiene más oxígeno que el usual, 21 por ciento, puede reducir el volumen a bombear.

Sea la que fuere la composición química del medio, es imperativo que todos los componentes estén perfectamente mezclados, de modo que el microorganismo tenga un acceso eficaz a los nutrientes y al sustrato. La mayoría de las bacterias y algunas levaduras crecen comúnmente como células individuales o como agregados de varias de ellas, y permanecen suspendidas en el medio. Ni siquiera cuando se trata de una población densa influyen sobre las propiedades físicas del fluido donde se están desarrollando, aparte de hacerlo viscoso. Pero hay casos en que las células secretan polímeros naturales que incrementan grandemente la viscosidad del medio; además, pueden formar grandes agregados o crecer como una película mucosa sobre una superficie.

Otras bacterias y levaduras, así como la mayoría de los mohos, se comportan, en lo relativo a su crecimiento, de un modo bastante diferente. Cuando pueden desarrollarse sin alteraciones, forman una película fuerte y continua; al dispersarse por todo el medio fluido, por agitación vigorosa, originan una pulpa fibrosa. Si se les suministra nutrientes suficientes, las células proliferan hasta que la suspensión adquiere una consistencia de papilla. Esos cambios en el medio inciden en la tecnología del proceso. Por ejemplo, el oxígeno borboteado a través de un medio acuoso es absorbido rápidamente y transportado hasta los lugares donde se necesita. En un medio pastoso o gelatinoso, se entorpece la absorción y transporte de oxígeno.



SECUENCIA DE ETAPAS en la aplicación industrial de una bacteria, una levadura o un hongo, como catalizador biológico. Dicha seriación, aunque varía de un proceso a otro, sigue siempre el esquema aquí representado. Las líneas continuas señalan las principales etapas que comparten todos los procesos; las discontinuas, variantes opcionales. En la parte superior izquierda se muestra la preparación del catalizador. Con frecuencia intervienen células enteras. Sin embargo, de manera creciente, se aíslan los enzimas (los verdaderos agentes transformadores) de las células. También va en incremento la inmovilización de las células o los enzimas para retenerlos dentro del reactor. En la parte superior derecha se representa la preparación del medio. El medio suele ser acuoso y lleva en solución o suspensión los sustratos: las sustancias que transforma el catalizador. En aquellos casos en los que células vivas constituyen el catalizador es necesario suministrar nutrientes. Se ajusta el *p*H del medio; se esteriliza éste, al objeto de evitar la contaminación por organismos extraños. En la parte inferior se esquematizan la síntesis y subsiguiente aislamiento del producto. Primero, actúa el catalizador sobre sus sustratos; luego, se separan catalizador y medio. Algunos productos (como la vitamina B_{12}) permanecen unidos al catalizador. Otros (como la penicilina) se excretan al medio. El producto se halla en una solución diluida de la que debe purificarse.

Es obligado destacar que las etapas biológicas rara vez son las únicas en un proceso industrial. El pretratamiento de los materiales nutritivos y la extracción, purificación y posterior alteración de los productos son factores importantes en la economía de la microbiología industrial. La importancia de las etapas no biológicas puede contemplarse considerando dos ejemplos: la producción de etanol y la de cobalamina.

La materia prima usual en la producción de etanol son melazas, cuyo 50 por ciento, aproximadamente, es azúcar, y maíz, en el que el principal hidrato de carbono es almidón. Las levaduras pueden metabolizar el azúcar, pero no el almidón. Uno y otro material, sin embargo, requieren una extensa preparación antes de que puedan introducirse las células de levaduras en el tanque. Las melazas se han de diluir y acidificar y quizá tengan que añadirse nutrientes menores y separar otras sustancias (tales como hierro), que están presentes, a veces, en concentraciones suficientemente altas para inhibir el crecimiento de la levadura o la formación de alcohol. Cuando el maíz es el material nutritivo, se cuece el grano para solubilizar el almidón; luego, se convierte el almidón en azúcar por la acción de enzimas de la malta. Como en las melazas, también aquí quizás haya que añadir nutrientes y tener que ajustar el *p*H. Todos estos procesos requieren tiempo, equipo y energía.

Al término de la fermentación del azúcar, el etanol supone del 6 al 8 por ciento del medio consumido, que incluye, además, subproductos, residuos, nutrientes no utilizados y muchos constituyentes menores. El etanol se separa y purifica por destilación. En la fermentación de cereales, importa recuperar también el residuo sólido; lo que se hace por evaporación y secado. El residuo está compuesto de células de levadura muertas, proteínas del cereal y otras sustancias, constituyendo un alimento muy nutritivo para animales. La venta de este residuo abona la posibilidad económica de fabricar etanol a partir de cereales.

En la producción de cobalamina y sustancias relacionadas, el catalizador biológico no es una levadura sino una bacteria. Varias especies pueden llevar a cabo esa síntesis. La preparación del cultivo bacteriano utilizado como inóculo y del medio de crecimiento tienen mucho en común con los procesos seguidos cuando se utilizan levaduras, aunque se requieren controles más estrictos para evitar la contaminación del cultivo. Pero la diferencia clave aparece al término de la conversión: la

NUTRIENTE	MATERIA PRIMA	PRETRATAMIENTO
FUENTE DE CARBONO	AZUCAR DE MAIZ	
GLUCOSA	MELAZAS	"INVERSION": SACAROSA → GLUCOSA + FRUCTOSA
	ALMIDON	COCCION SEGUIDA DE SACARIFICACION: ALMIDON → GLUCOSA
	CELULOSA	MOLIENDA Y COCCION SEGUIDA DE SACARIFICACION
GRASAS	ACEITES VEGETALES	
HIDROCARBUROS	FRACCIONES DE PETROLEO	PURIFICACION POR DESTILACION
FUENTE DE NITROGENO	PROTEINA DE HARINAS DE SOJA	
PROTEINA	LICOR DE MACERADO DE MAIZ (DE LOS MOLINOS DE MAIZ)	
	PRODUCTOS SOLUBLES DE DESTILERIAS (DE FABRICACION DE BEBIDAS ALCOHOLICAS)	
AMONIACO	AMONIACO PURO O SUS COMPUESTOS QUIMICOS	
NITRATO	SALES NITRICAS	
NITROGENO	AIRE (PARA ORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO)	
FUENTE DE FOSFORO	SALES FOSFORICAS	

ENTRE LOS NUTRIENTES para el catalizador se citan el carbono, nitrógeno y fósforo. La elección de una fuente se funda en razones económicas y biológicas. Así, la fuente de carbono de aprovechamiento más generalizado son los carbohidrados procedentes de cereales y otros productos vegetales. Muchas fuentes requieren un pretratamiento específico. Si atendemos al almidón, por ejemplo, hay que cocerlo y transformarlo en azúcar antes de que la mayoría de los microorganismos lo conviertan en etanol.

mayor parte de la vitamina no se excreta al medio por la bacteria, como el etanol lo es por las levaduras, sino que se retiene en el interior celular. Hay que tratar, pues, las células de forma que desprendan la cobalamina y sustancias relacionadas, y así poder extraer un producto, de aproximadamente el 80 por ciento de pureza, que sirve de suplemento vitamínico en la alimentación animal. La pureza del 95 al 98 por ciento, que se exige en farmacología, sólo puede alcanzarse a través de un procedimiento de extracción mucho más complejo y eficaz.

Un rasgo común a casi todas las tecnologías biológicas es la necesidad de mantener condiciones asépticas. La razón de ello reside en que la mayoría de los productos de tales tecnologías son sintetizados por un cultivo puro: una población de organismos compuesta por una sola especie o incluso por una sola cepa de una especie. Si se contamina el cultivo por organismos extraños, éstos pueden interrumpir el proceso de varias formas. Pueden inhibir o interferir directamente la acción del catalizador biológico, si se trata de un enzima aislado o una célula viva; pueden, incluso, destruir completamente el catalizador. O, también, el organismo contaminante quizá no altere al catalizador pero sí destruya el producto. Por otra parte, los organismos extraños pueden introducir sustancias nocivas que sean difíciles de separar del producto final. En la fabricación de productos farmacéuticos, el riesgo de impurezas tóxicas reviste particular interés.

Con el fin de evitar la contaminación, se esterilizan todos los materiales que entran en el medio de cultivo, incluidos los grandes volúmenes de aire que precisan los procesos aeróbicos. Los organismos extraños se filtran del aire a través de un lecho grueso de lana de vidrio, que, a su vez, puede esterilizarse a intervalos con vapor. El vapor se emplea también para esterilizar los reactores, conductos y otras superficies con las que el medio está en contacto. Los aparatos deben diseñarse y operar de suerte que se reduzcan al mínimo las posibilidades de contaminación por organismos extraños. Esto se logra en buena medida manteniendo la esterilidad de los diversos puntos de entrada y salida del sistema. A pesar de todas las precauciones, la probabilidad de error humano o fallo mecánico es considerable y no son raros los casos de pérdidas graves.

En un proceso estático, todos o la mayoría de los componentes del medio se introducen junto al catalizador biológico al inicio de la operación. Esta mezcla se realiza, típicamente, en un recipiente cilíndrico cuya altura mide 2,5 o 4 veces su diámetro. La capacidad de estos recipientes oscila desde algunos cientos de litros hasta varias decenas de miles de ellos. En determinadas aplicaciones, el volumen puede adquirir una magnitud todavía mayor. Con anterioridad a los años 50, cuando se obtenían por fermentación alcoholes industriales, tales como butanol, el proceso se realizaba en tanques esféricos con una capacidad de hasta casi dos millones de litros. Al proyectarse el recipiente para la fabricación de determinados productos, antibióticos por ejemplo, suficientemente puros como para su uso farmacéutico, se construye de acero inoxidable o de una aleación inerte equivalente. Para aplicaciones menos exigentes basta un recipiente de acero al carbono o de acero con una cubierta resistente a la corrosión.

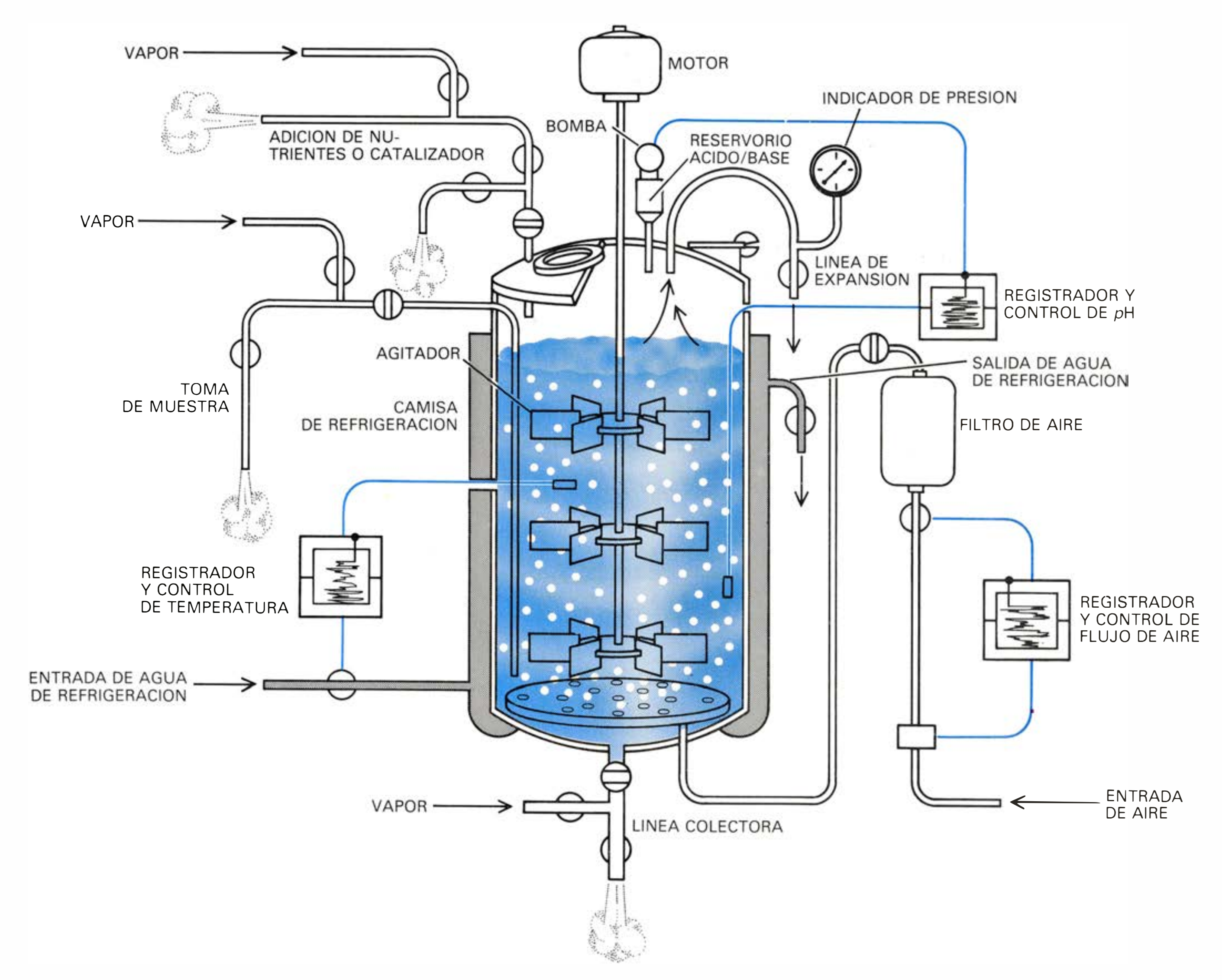
Una vez esterilizado el recipiente, se introducen en él los materiales de partida a través de una red de tubos y conducciones. Los distintos puntos de entrada del tanque están bañados por líneas de vapor para asegurar que el proceso opera asépticamente. El tanque va provisto de un eje central, dotado de diversas palas que mezclan continua e

íntimamente catalizador y constituyentes del medio. Los fermentadores poseen unas conducciones en espiral por su interior o bien unas camisas rodeándolos, por las que, haciendo circular vapor de agua, les llega el calor que requiere su esterilización y a cuyo través penetra también el calor o el enfriamiento necesario para mantener la temperatura óptima del proceso. Normalmente, los fermentadores van provistos de equipo para seguir y controlar la temperatura y *p*H del medio. Menos frecuente es que estén también dotados del equipo necesario para seguir y controlar la concentración de oxígeno disuelto en el medio.

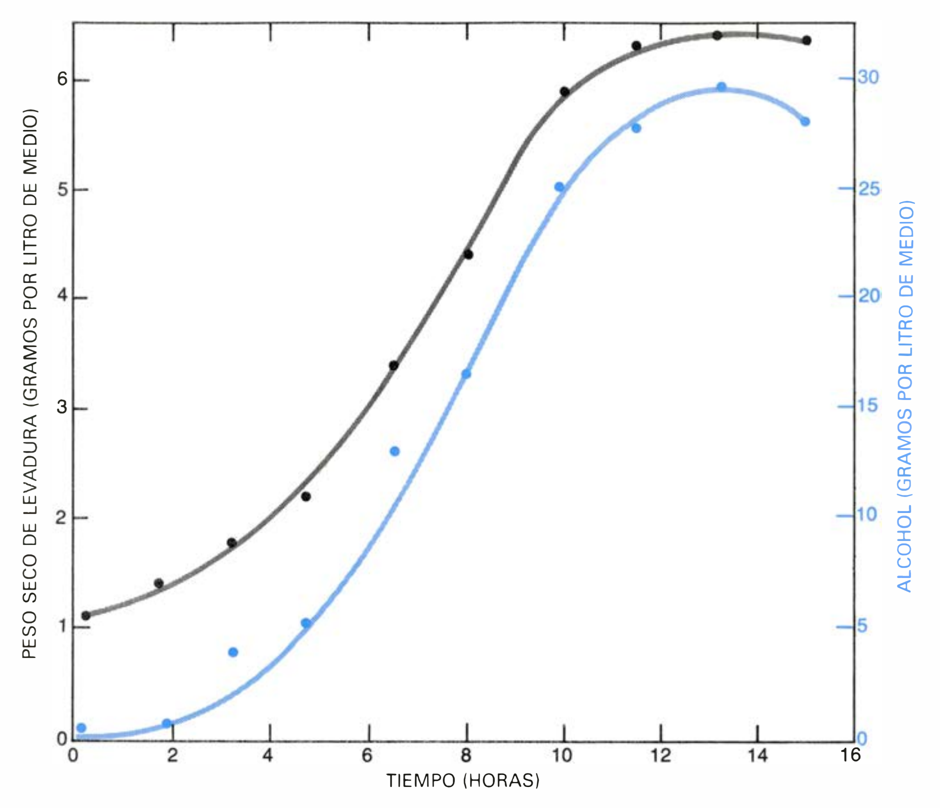
A medida que se va realizando la conversión biológica, quizá se precise ir añadiendo nutrientes al medio para mantener el crecimiento de los organismos; si el proceso es aeróbico se tendrá que suministrar oxígeno de modo continuo. A través de otras conducciones y tubos, se toman muestras del medio y del ambiente gaseoso del tanque, para su análisis. Cuando la concentración del producto alcanza su nivel máximo, la operación se da por finalizada y se saca el medio de cultivo por otro conducto adecuado para este fin.

En un cultivo estático es imprescindible la continua comprobación de las condiciones en el interior del tanque. Como se mencionó más arriba, la temperatura, *p*H y la concentración de oxígeno disuelto pueden registrarse sin solución de continuidad. Además de estos parámetros, resulta útil asimismo conocer la concentración de las sustancias que sirven de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo y, quizá también, la concentración de algún micronutriente crítico. Mayor interés encierra todavía conocer las cantidades de catalizador biológico presentes en el medio y su nivel de actividad. Con los métodos de que se dispone en la actualidad, no cabe la determinación de estos valores directamente en el recipiente de reacción, sino que hay que sacar muestras para su análisis en el laboratorio.

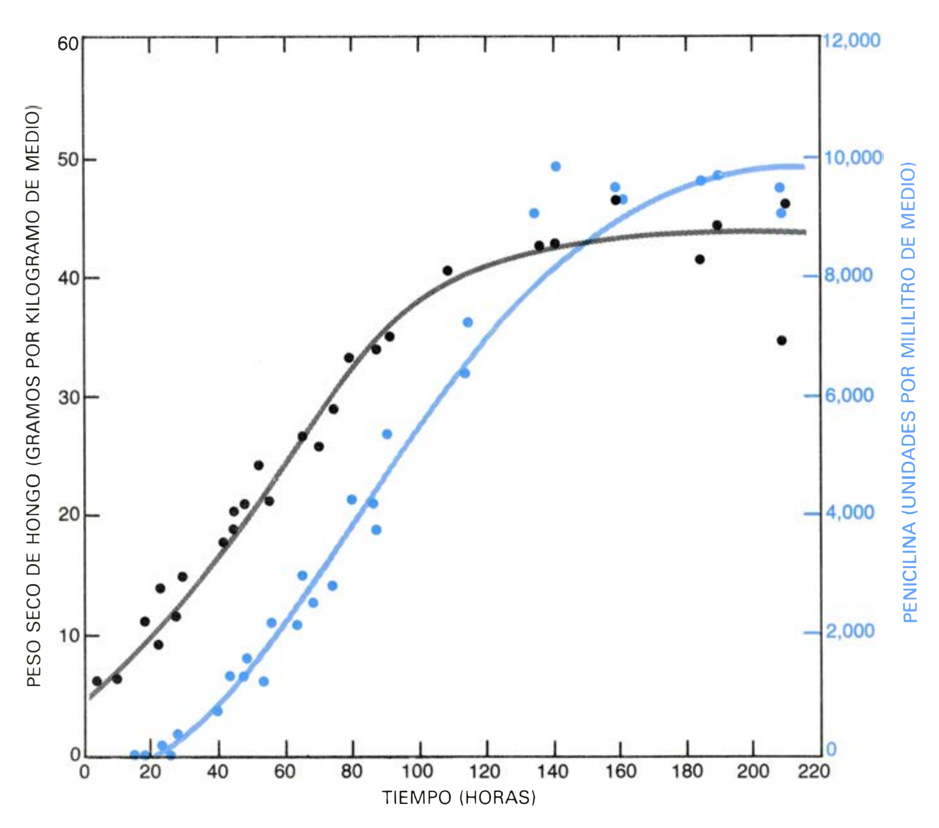
En principio, un proceso industrial continuo ofrece numerosas ventajas sobre el realizado en cultivos estáticos secuenciales. Así, el cultivo continuo presenta, en potencia, un mayor volumen para una instalación de un tamaño determinado. De una manera muy simplificada, se consigue una operación continua modificando sencillamente un reactor estático para poder agregar –de forma incesante– nutrientes y sustrato y separar –sin interrupción– los productos de la reacción. Un aparato así modificado se le llama tanque reactor continuo agitado. Básicamente se puede controlar de dos for-



REACTOR ESTATICO, usado para la mayoría de las actuales aplicaciones de la microbiología industrial. A grandes rasgos, se trata de un recipiente donde se mezclan el medio y el catalizador biológico, y hallan el ambiente óptimo en el que reaccionar. Se regulan la temperatura y el *p*H. El aire filtrado, enriquecido a veces con oxígeno, se borbotea a través de la mezcla. Se toman muestras para ensayos químicos y biológicos. Para evitar la contaminación se siguen dos estrategias: dirigir vapor de agua a través de las diversas entradas para mantenerlas estériles y mantener la presión interior del recipiente superior a la presión atmosférica. Pasado un tiempo, se vacía el cultivo del fermentador, para aislar y purificar así el producto de la reacción.



EL METABOLITO PRIMARIO se sintetiza por un microorganismo en el curso del proceso metabólico que mantiene vivas las células y posibilita su crecimiento. En un tanque reactor, un metabolito primario se acumula simultáneamente con la acumulación de las células que lo sintetizan. Las gráficas muestran la acumulación de células de levadura y la concomitante de etanol, a medida que transcurre el tiempo.



EL METABOLITO SECUNDARIO no se forma como resultado directo del metabolismo que mantiene viva la célula. Por tanto, la acumulación de un metabolito secundario, en un recipiente reactor, sucede después del crecimiento de las células que lo producen. El gráfico muestra la acumulación de células de hongo (*negro*) y la subsiguiente de penicilina (*color*). Raras veces los valores de temperatura y *p*H que facilitan el crecimiento celular coinciden con los óptimos para la síntesis de un metabolito secundario. En un proceso estático se busca una solución de compromiso entre los dos grupos de condiciones óptimas.

mas. En el primer método se vigila la turbidez o viscosidad del flujo de salida. La turbidez, causada por el crecimiento microbiano, constituye una medida de la velocidad a la que salen las células del tanque. Esta medida controla la velocidad a la cual hay que introducir nutrientes. Los reactores de este tipo se llaman turbidostatos.

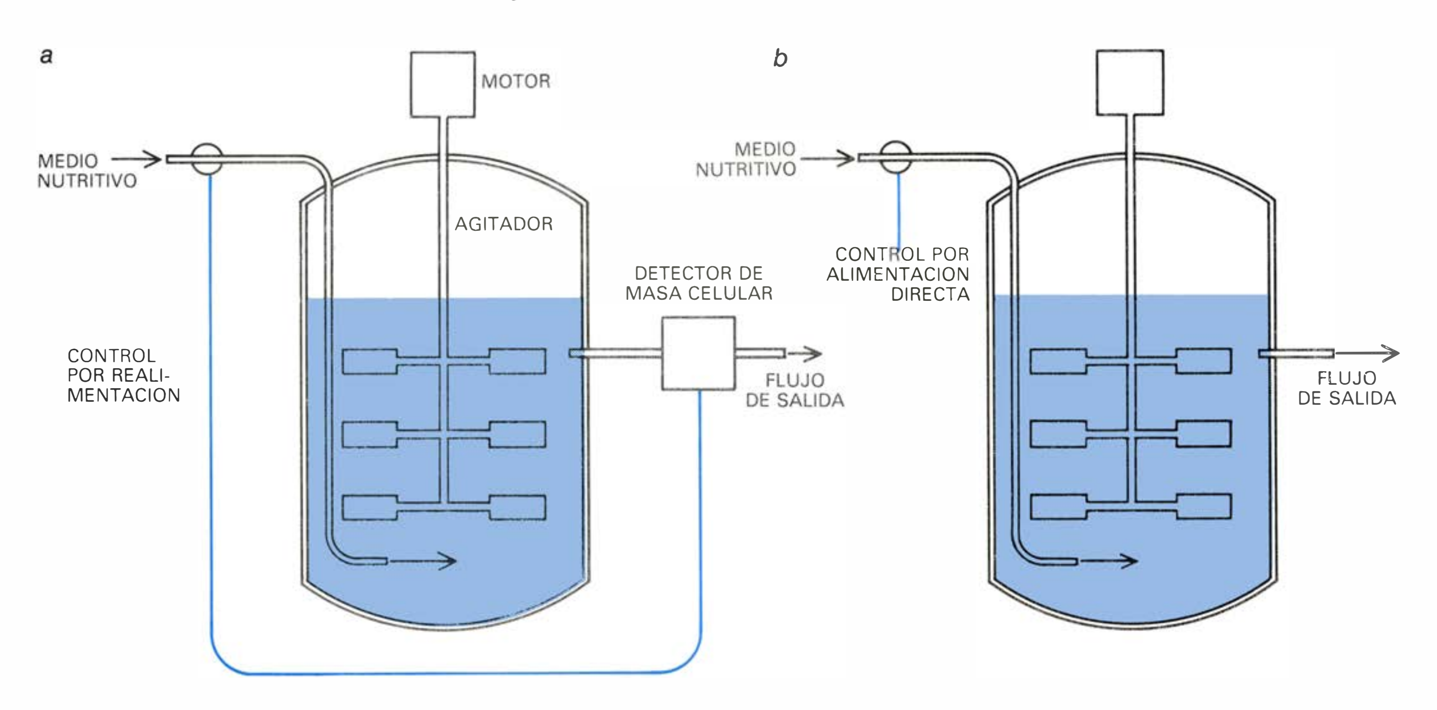
Más simple es el segundo método para controlar un proceso continuo; puede aplicarse en aquellos casos en los que el producto de la reacción no son las células. Los reactores de este tipo se denominan quimiostatos; la reacción se controla en ellos por análisis del flujo de entrada. Cuando se opera en un quimiostato, se fija la concentración de entrada en el reactor de un nutriente crítico en un nivel tal que los demás nutrientes estén en exceso. El nivel del nutriente crítico limita entonces la capacidad de proliferación del microorganismo. Este método comporta una seria desventaja: el medio que sale del reactor arrastra nutrientes no consumidos en una cantidad significativa.

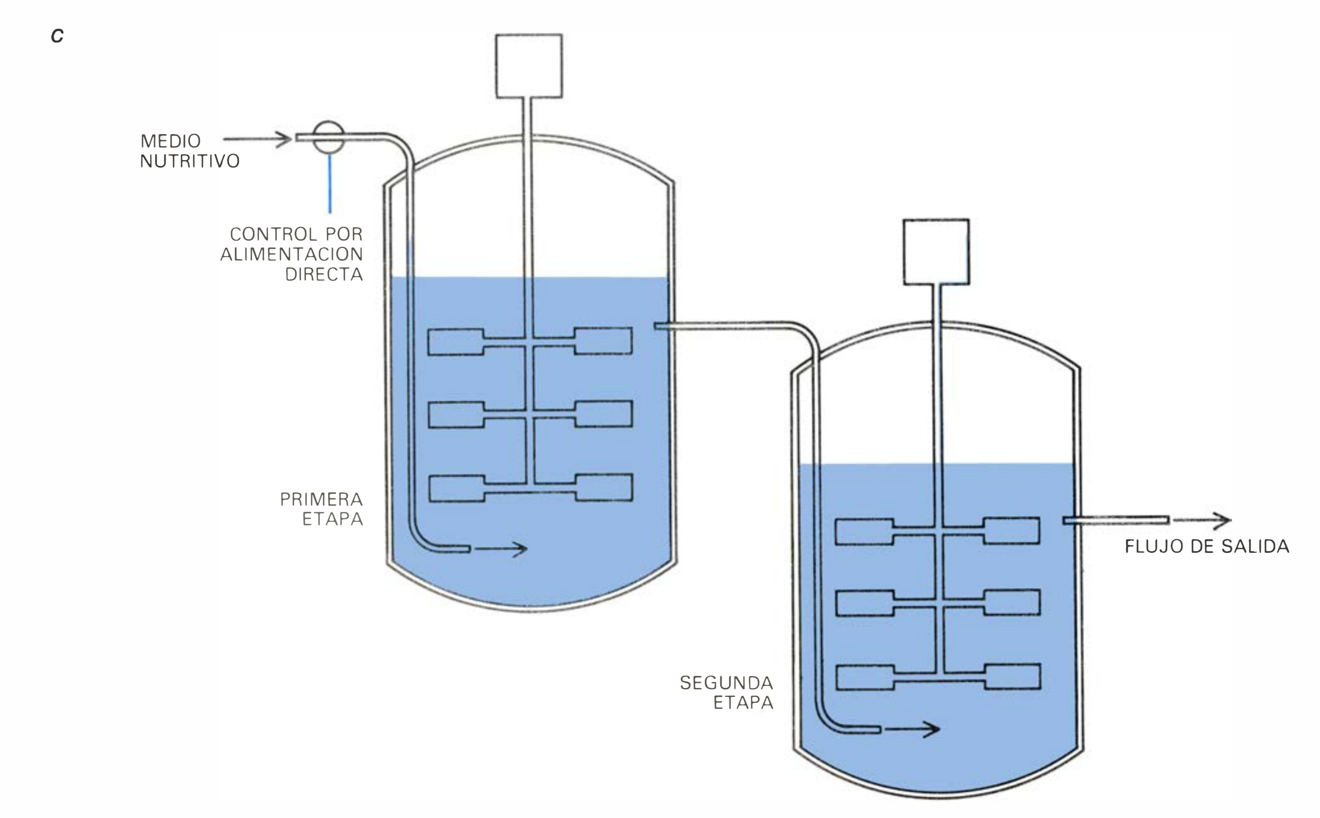
Modelos matemáticos de la acción del quimiostato, junto con estudios experimentales, indican que no se puede obtener, con un quimiostato de una sola etapa y de un tamaño práctico, una alta concentración de producto y bajas concentraciones de material nutritivo no consumido. La ineficacia se agranda de un modo particular en la síntesis de productos tales como la penicilina, que es un metabolito secundario; se realiza por células vivas, pero su síntesis no tiene lugar en el metabolismo primario, durante el período activo de crecimiento de las células. Es característico de la producción industrial de metabolitos secundarios que el crecimiento del organismo preceda a la acumulación del metabolito en un margen de tiempo significativo. También se distingue porque las condiciones de temperatura, *p*H y aquellas otras que son óptimas para el crecimiento del organismo difieren de las óptimas para la formación del producto. Un quimiostato de una sola etapa puede ofrecer, como máximo, un compromiso entre los dos ambientes óptimos diferentes. Para proporcionar condiciones más favorables para cada etapa del ciclo vital, hay que diseñar los quimiostatos de suerte que el medio fluya en cascada a través de una serie de tanques. Pero es difícil operar todos y cada uno de los tanques y no parece probable que la producción adquiera un volumen suficiente para justificar la inversión. La única aplicación donde los quimiostatos de una sola

etapa y multietapas han encontrado utilidad es en el tratamiento biológico de residuos.

Otro beneficio potencial que comporta trabajar con un método continuo es la reducción de pérdidas del catalizador. Aunque lo que caracteriza al catalizador es que no se consume en el curso de la reacción, en la mayoría de los procesos estáticos se desecha junto con el medio consumido. Pero los residuos pueden ser muy caros; el valor de un catalizador biológico es por lo menos igual al del volumen de los nutrientes consumidos en el crecimiento de las células.

Hay dos procedimientos para limitar la cantidad de catalizador que se pierde en el ciclo. Uno es reciclando. En las modernas aplicaciones industriales cuesta separar las células vivas de un





TANQUES REACTORES CONTINUOS Y AGITADOS. Representan el esfuerzo por adaptar la tecnología de los cultivos estáticos a la operación continua. En un turbidostato (*a*), la velocidad a la que las células salen del recipiente reactor (medida por la turbidez o viscosidad del flujo de salida) gobierna la velocidad a la que entran en el tanque los nutrientes. En un quimiostato (*b*), la velocidad a la que entra en el reactor un nutriente crítico se ajusta de suerte que limite la velocidad de la reacción. En un quimiostato de dos etapas (*c*), el mecanismo de control no cambia, pero sí pueden diferir las condiciones en los dos reactores. Tal disposición es útil, por ejemplo, en la producción de un metabolito secundario o en las sucesivas etapas del tratamiento de residuos.

flujo fluido y permitir su retorno al reactor. Las células suelen sufrir daños y, lo que es más frecuente todavía, el reactor se contamina con microorganismos extraños.

El otro sistema para reducir pérdidas es el de mantener el catalizador en el interior del reactor. La técnica más común emplea un lecho de relleno: un soporte sólido sobre el que se estimula el crecimiento de las células. Se ha empleado ampliamente un reactor continuo de este tipo para fabricar vinagre. Se percola el vino diluido o la sidra fermentada a través de un lecho sobre el que se ha establecido un cultivo de microorganismos que oxidan el etanol a ácido acético. Los microorganismos, constituidos por un cultivo mixto y no por un cultivo puro, forman una película mucosa sobre la superficie del lecho. Se ha desarrollado un procedimiento de esquema similar para el tratamiento de aguas de desecho y otros residuos. El flujo de residuos gotea a través de un filtro de fragmentos de piedra, cerámica o plástico, donde una película microbiana atrapa las partículas residuales y las oxida.

En los últimos años se han ideado varios métodos nuevos de inmovilización de enzimas y células enteras. El primero, y más simple, es la adsorción: las moléculas del enzima o las células se adhieren sin cohesión (sin unión química) a la superficie de un material como alúmina, carbón activo, arcilla o celulosa. Con el tiempo, el agente adsorbido se lava; sorprendentemente, se ha comprobado que disfrutan de una larga vida útil. Para un enzima aislado se puede crear una unión más firme por formación de un enlace químico entre la molécula enzimática y el material de soporte, que puede ser celulosa, vidrio o un polímero artificial. De ello resulta una preparación estable, capaz de proporcionar un servicio duradero; por otra parte, la fijación del enzima no parece alterar gran cosa su actividad. En ambas técnicas, la práctica usual consiste en dividir el material soporte en pequeñas partículas, formando un lecho de relleno. Cabe, asimismo, unir el agente catalítico a una membrana lisa y continua o a la superficie de un tubo.

Un tercer método de inmovilización, válido para células y enzimas, es el de atraparlas en una matriz de polímero. Si humedecemos, con agua, almidón, gel de sílice o algún otro polímero, forman una malla de fibras con huecos donde pueden quedar atrapadas las moléculas enzimáticas o las células. Pero esta técnica presenta un inconveniente: las moléculas del sustrato, del producto final y de los nutrientes deben difundirse a través de la matriz sólida, reduciendo la velocidad de reacción. Hay ventajas que compensan esta limitación; una principal: las células vivas pueden ser retenidas firmemente y sin dañarse.

En la técnica llamada microencapsulación, los enzimas o las células se envuelven en una membrana esférica de polímero. Las cápsulas resultantes poseen un diámetro que oscila desde cinco a trescientos micrometros; por su aspecto recuerdan a células alargadas. La composición de la membrana se escoge de modo que sea semipermeable; las moléculas del sustrato y del producto, pequeñas en comparación, atraviesan la membrana con plena libertad, infranqueable para las moléculas de un enzima, mayores, o la todavía más grande estructura de una célula. La última novedad en el esfuerzo por retener el catalizador se ha copiado de la industria química. Nos referimos al reactor de lecho fluido. El dispositivo básico de tal reactor es un tubo vertical que se ensancha en la parte superior. El chorro o flujo de entrada se fuerza hacia arriba desde el fondo; a medida que se incrementa el área de la sección con la altura, decrece la velocidad del flujo. El catalizador, que está suspendido en el chorro del fluido, sedimenta en un nivel del reactor por debajo del cual se separa el flujo líquido. El catalizador debe poseer una estructura que le permita mantenerse suspendido en el reactor. En algunas aplicaciones, el catalizador (que puede ser o bien un microorganismo o bien un enzima) se inmoviliza sobre partículas de carbón.

Dadas las ventajas evidentes del método de flujo continuo ¿por qué ha avanzado tan poco en el desplazamiento de los métodos de fermentación estáticos? Hay razones de orden estrictamente técnico. Es más difícil mantener las condiciones asépticas en un reactor continuo. Cuando se fabrica un

LECHO DE RELLENO. Se trata de una técnica de probada validez en las industrias de tratamiento de residuos y la fabricación de vinagre. El catalizador es una película viscosa de microorganismos que se adhiere a un lecho sólido. Con frecuencia es un cultivo natural. El medio fluye por el lecho.

LECHO FLUIDO. En esta nueva técnica, el catalizador biológico está inmovilizado en partículas que se hallan suspendidas en un flujo ascendente de medio fluido. Un ensanchamiento en la parte superior del reactor disminuye la velocidad del flujo y permite mantener así al catalizador en el interior.

producto mediante proceso estático, pueden esterilizarse todos los componentes del sistema después de cada lote de fabricación, por lo que cualquier organismo contaminante tiene sólo un período de tiempo limitado para crecer y proliferar. Si se quiere sacar un lucro económico de la operación continua, el reactor deberá funcionar sin interrupción durante largos períodos de tiempo. En esa última situación, cualquier microorganismo que logre saltar las barreras y contamine el medio podría crecer sin limitaciones.

Este tipo de dificultades hallarían solución si hubiera suficiente incentivo económico para superarlas. Pero el volumen real de producción de la mayoría de los procesos resulta bastante exiguo, de modo que el rendimiento que se saca de un producto por procesos de flujo continuo está lejos de ser pleno. Por otro lado, los métodos de producción por cultivos estáticos ofrecen una gran flexibilidad operativa: un tanque de reacción y los aparatos complementarios pueden utilizarse para fabricar un lote de un producto determinado y aplicarse, a continuación, a la producción de otra sustancia con mayor demanda. Esta versatilidad adquiere una importancia particular en la industria farmacéutica, donde la variedad de productos a fabricar es grande y, pequeña, la cantidad requerida de cada producto. Cabe destacar que la única área donde se utilizan predominantemente procesos continuos, el tratamiento de aguas residuales, es, por ahora, la mayor industria microbiológica, en términos de volumen procesado.

Concluida la transformación biológica, hay que separar, del medio consumido, el producto o productos obtenidos y, luego, purificarlos. En este punto existen un sinfín de dificultades que son peculiares de la industria microbiológica. En primer lugar, muchos productos son químicamente lábiles; ello significa que quizá debamos controlar cuidadosamente la temperatura y el *p*H de la mezcla. Puede ser necesario, también, excluir cualquier traza de metales u otras impurezas. En segundo lugar, el producto se encuentra, por lo general, disuelto o suspendido en un gran volumen de agua: habrá que separar el agua del producto o el producto del agua. A veces, bastará con la evaporación o destilación. La destilación consume mucha energía y su costo puede constituir un gasto sustancial con respecto al valor del producto. Por otra parte, cuando la molécula producida es lábil, la evaporación o destilación pueden destruirla. Inconvenientes que han urgido el desarrollo de múltiples técnicas menos violentas.

Tenemos una de ellas en la extracción por disolventes. La solución acuosa que contiene el producto se mezcla con un segundo líquido, inmiscible con el agua, donde el producto posee una mayor solubilidad. Otra técnica es la de adsorción. En este caso, las moléculas producidas se separan de la solución al ligarse a la superficie de un material sólido insoluble. En la actualidad están en auge las técnicas de separación por membrana: el medio atraviesa una membrana que impide el paso del producto, pero no del resto de los componentes de aquél. La mayoría de las técnicas citadas se aplican al medio tras haber separado el catalizador biológico por procedimientos tales como filtración o centrifugación. Por último, se purifica el producto. El volumen del material que se procesa en este punto es pequeño y las técnicas utilizadas son específicas de cada producto.

La explotación de los procesos bioquímicos, iniciada con los alimentos y bebidas cuando emergieron las aplicaciones industriales en el siglo XX, estuvo arraigada en la secuencia de etapas que habían ido estableciendo las prácticas tradicionales. La primera etapa continuó siendo la purificación de los materiales nutritivos y el desarrollo de un cultivo de inóculo o cultivo iniciador: una población natural de microorganismos, donde predomina el organismo cuya actividad catalítica se desea aprovechar. Le sigue la conversión biológica propiamente dicha. Con la fabricación de etanol para su uso como solvente, no como bebida, surgió la necesidad de encontrar técnicas que permitieran aislar y purificar productos específicos.

La persistencia de los métodos tradicionales no se puede atribuir exclusivamente a la inflexibilidad de los primeros industriales. Los trabajos de los microorganismos en un proceso industrial son complejos y delicados y muchos aspectos de su funcionamiento resultan desalentadores, aún hoy, cuando en el mundo existe una gran y próspera industria. La mayor parte de la industria está limitada a la producción de sustancias de gran valor por medio de cultivos estáticos en pequeña escala. Pero la economía mundial está cambiando. Si se quiere una microbiología industrial competitiva en la fabricación de carburantes y productos químicos industriales habrá a su disposición conocimientos y experiencia sobrados para conducir el esfuerzo.



Microbiología agrícola

A pesar de la dificultad que entraña la introducción de nuevos genes en las plantas a través de técnicas de ADN recombinante, se puede avanzar bastante manipulando microorganismos que viven asociados a aquéllas

Winston J. Brill

Imagínese el lector que se halla en una explotación agraria mecanizada. Agáchese al suelo y tome un puñado de tierra. ¿Qué apreciará si lo examina finamente? Un conjunto ingobernable de microorganismos que compiten entre sí. Se cuentan por miles las especies que contienden en el suelo por obtener lo que todas ellas necesitan: nutrientes y energía. Al propio tiempo, los productos de su metabolismo alteran la composición química del suelo donde habitan. Más aún, los propios microorganismos evolucionan en respuesta a la presión del ambiente, presión inducida a su vez por la evolución de la flora microbiana asociada. Supongamos que se introduce un nuevo tipo de bacteria, equipada con un bagaje genético que la capacite, por ejemplo, para invadir las raíces de determinadas plantas de cultivo. En la hipótesis de que esa bacteria sobreviva a los procesos competitivos mencionados, y se adapte a las variaciones ambientales, quizá no logre cumplir la función para la que se seleccionó. Puede encontrarse con que el sistema radical ya esté ocupado por otras especies microbianas.

La agricultura nos ofrece abundantes muestras de ese tipo de interferencias, que ilustran la diferencia que existe entre lo que ocurre en un tanque de fermentación y lo que realmente sucede en el campo. Pero hay semejanzas también: tanto en la microbiología agrícola como en la industrial, el objetivo o intención final es hacer frente a las necesidades del hombre, mediante la crianza, cultivo y cosecha de organismos vivos. Si tomamos el tanque de fermentación en representación del medio agrícola, no deberemos olvidar que se trata de un sistema sometido a un control extraordinariamente preciso. En él, la población microbiana se limita normalmente a individuos de una sola especie. A la hora de considerar las posibles aplicaciones y uso potencial de la microbiología agrícola en el aumento de la producción, se ha de empezar por estudiar la delicada cuestión de las interacciones de los microorganismos, entre sí y con la biosfera en general.

La creciente demanda de alimentos y otros productos agrarios justifica ampliamente el enorme esfuerzo investigador que será necesario acometer para aplicar a la agricultura los métodos de la microbiología. Se ha sugerido que, por manipulación o "ingeniería" de las plantas de cultivo y de los microbios de que ellas dependen, se podrían producir semillas híbridas capaces de satisfacer sus requerimientos de nitrógeno directamente de la atmósfera. Ningún vegetal de interés agrícola posee hoy semejante facultad; el nitrógeno lo han de fijar (convertir en forma biológicamente útil) los microorganismos o la fabricación industrial de fertilizantes nitrogenados, proceso este último que precisa de un dispendio elevado de combustible fósil. El campesino de los países desarrollados gasta por valor de 1000 millones de dólares al año en fertilizar sus cultivos de maíz, lo que explica, entre otros motivos, que el programa de investigación sobre fijación de nitrógeno se halle en continuo crecimiento.

Dentro del marco de la investigación biológica, otras líneas pueden conducir a una aceleración de la fotosíntesis y al desarrollo de cultivos aptos para suelos salinos o de acusada acidez. Se trata de unos objetivos ambiciosos, cuya explotación comercial quizá no vean los próximos diez años. De todos modos, a lo largo de ese intervalo, el agricultor tendrá a su alcance la información necesaria para una modificación y explotación racionales de la constitución microbiológica de sus tierras. El campesinado empieza ya a reconocer el enorme potencial que encierran las técnicas microbiológicas aplicadas a la investigación de la citología vegetal. La tecnología del ADN recombinante puede mejorar las plantaciones y desarrollar asimismo tipos de cultivo totalmente nuevos. Hasta la fecha, sin embargo, donde ha causado mayor impacto esta tecnología ha sido en los laboratorios de las industrias, que se hallan en estado de alerta ante la posibilidad de aplicar a la agricultura ciertos métodos biológicos. Varias decenas de centros de investigación se han puesto manos a la obra, concentrando, sobre todo, su atención en la obtención de microorganismos de interés agrario o en el uso de técnicas microbiológicas en la manipulación vegetal. La naturaleza revolucionaria de estas investigaciones queda expresada por el hecho de que casi todos estos laboratorios han surgido en los dos últimos años.

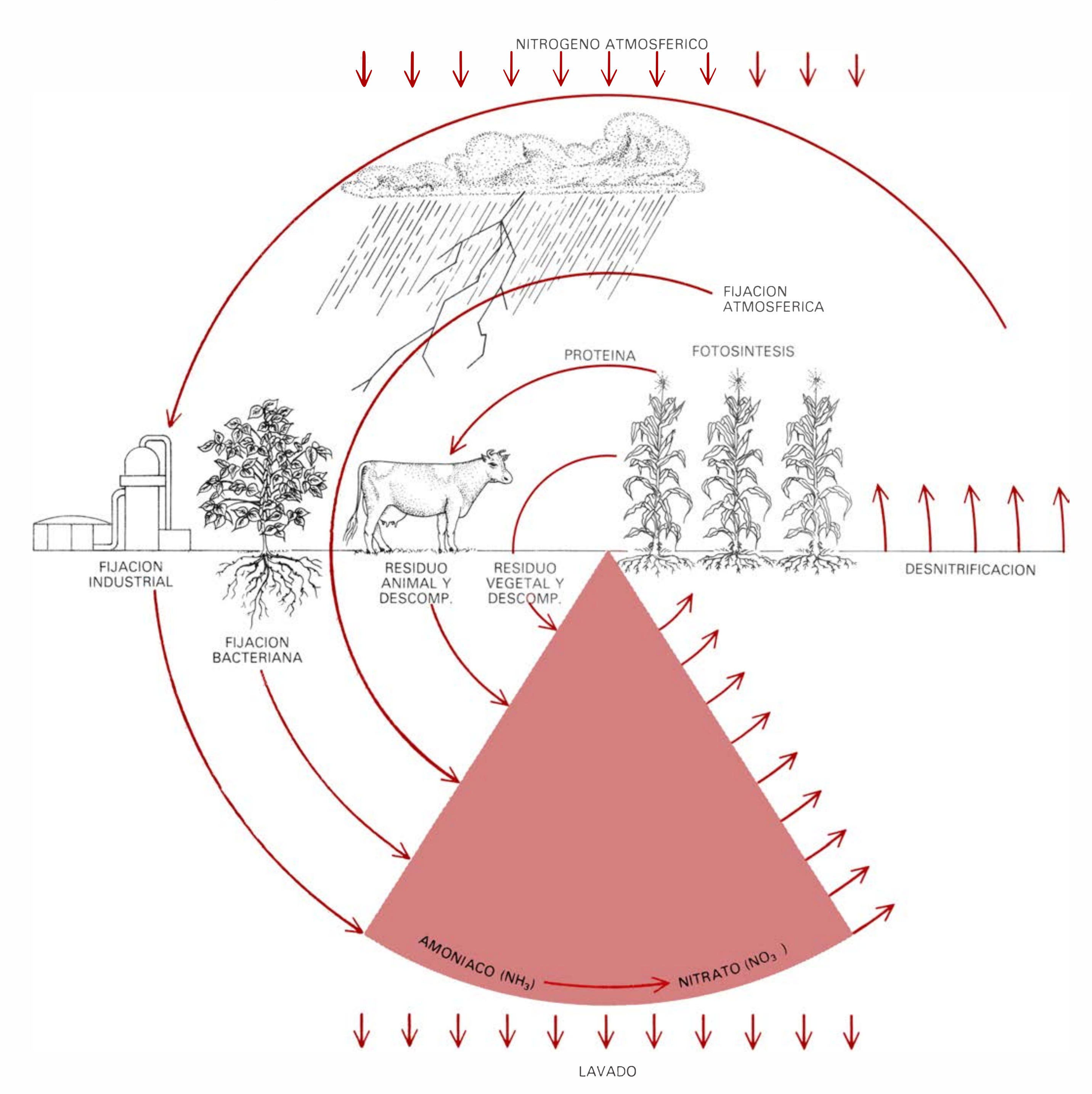
¿Cómo aplicar las técnicas microbiológicas a la agricultura tradicional? Hay tres vías principales. En primer lugar, los microorganismos beneficiosos para las plantas (o diseñados con tal fin) pueden cultivarse en tanques de fer-

ENTRE LOS MICROORGANISMOS UTILES para la agricultura figuran las bacterias del género *Rhizobium*, que aparecen infectando un pelo radical de una planta de trébol. En la microfotografía, realizada por B. Ben Bohlool, de la Universidad de Hawai en Manoa, las bacterias se marcaron con un colorante fluorescente que les da una coloración verde-amarillenta. Se forma un canal de infección que va desde el extremo del pelo al interior de la raíz. La bacteria *Rhizobium* vive simbióticamente en las raíces del trébol y otras leguminosas; las bacterias aportan a la planta el nitrógeno que fijan; la planta, a su vez, nutre a las bacterias. Esta clase de interacciones de microorganismos con plantas ofrecen al investigador varias posibilidades para el uso de los nuevos métodos de la ingeniería genética en procesos de interés agrícola. Por ejemplo, la capacidad fijadora de nitrógeno de la bacteria se podría aumentar por modificación genética, o podría conseguirse que la bacteria colonizara plantas no leguminosas. Sin embargo, para que estos organismos sean eficaces, han de competir ventajosamente con las estirpes indígenas del suelo.

mentación para su posterior introducción en el suelo. En segundo, se pueden aislar células individuales de tejidos vegetales y cultivarlas en una solución nutritiva. En estos cultivos celulares se puede acelerar la velocidad de mutación, permitiendo así una selección de especies prometedoras, el desarrollo de híbridos que no se podrían conseguir por las técnicas ordinarias de cruzamiento y, finalmente, la producción, en grandes tanques de fermentación, de algunos compuestos de origen vegetal, tales como digitalina, piretrina (pesticida natural) y extracto de regaliz.

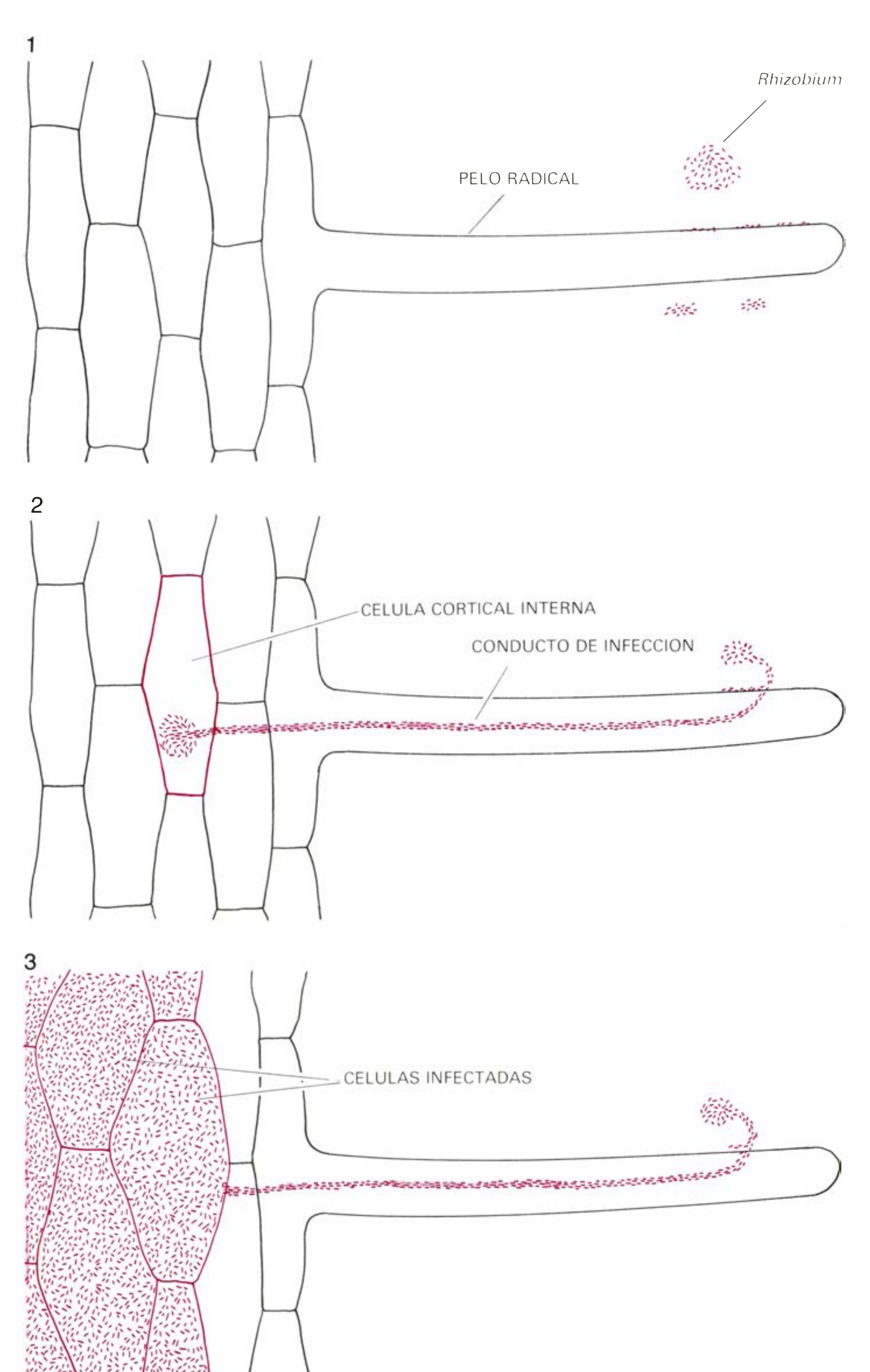
En tercer lugar, se puede introducir material genético foráneo dentro de la célula vegetal, una técnica que podría abrir nuevas perspectivas en los estudios de ingeniería genética de las propias plantas. Estas técnicas se encuentran poco desarrolladas, si se comparan con los logros conseguidos en bacterias con ADN recombinante. La posibilidad de insertar genes de plantas en bacterias, y obtener así proteínas vegetales mediante el cultivo de bacterias en tanques de fermentación, quizá convendría que antecediera a la aplicación de la ingeniería genética al ADN vegetal.

La explotación y uso de los microorganismos del suelo para fines agrícolas



CICLO DEL NITROGENO: mantiene un equilibrio entre las dos grandes fuentes de compuestos nitrogenados, a saber, la atmósfera y la corteza terrestre. Las plantas verdes sólo pueden utilizar nitrógeno cuando éste se encuentra formando parte de compuestos químicos, amoníaco (NH_3) por ejemplo; por cuyo motivo no pueden extraer directamente el nitrógeno de la atmósfera, donde existe en forma de moléculas diatómicas (N_2). Ello condiciona que el nitrógeno tenga que fijarse industrialmente o por procesos bacteriológicos u otros naturales, como en tormentas de fuerte aparato eléctrico. Aun cuando las plantas sólo necesitan de una pequeña parte del nitrógeno total que se les suministra, la fijación de dicho elemento ha de ser constante, ya que el suelo pierde nitrógeno por el drenaje y la recogida de la cosecha. Hay que considerar también las pérdidas debidas a la acción de las bacterias desnitrificantes.

no constituyen ninguna novedad. Ya en la antigua Roma se sabía que las leguminosas (judías, cacahuete, alfalfa, soja, guisante, trébol y altramuz) aumentaban la fertilidad de la tierra. Era práctica frecuente acarrear tierra de campos donde se habían cultivado leguminosas y verterla en lugares destinados, por primera vez, a esa cosecha. Los romanos no podían saber que la justificación de tan importante práctica experimental residía en la presencia de bacterias del género *Rhizobium*, que infectan las raíces de algunas leguminosas y fijan nitrógeno atmosférico [véase "La productividad de prados mediterráneos", por Arturo Caballero, Francisco Gil y Miguel Berbel; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, marzo de 1977, y "Fijación biológica de nitrógeno", por Wiston J. Brill; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, mayo de 1977]. Del propio significado de la palabra infectar se seguiría que la introducción de *Rhizobium* en las plantas leguminosas guardaría relación con un proceso patogénico. Nada de ello: la planta coopera. La bacteria *Rhizobium* entra en una relación simbiótica con el vegetal: la bacteria recaba alimento de la planta y le proporciona a ésta, a su vez, nitrógeno utilizable en forma de amoníaco (NH_3). Entre ambas media una relación íntima, en virtud de la cual la bacteria penetra en las raíces de la leguminosa y forma protuberancias visibles, llamadas nódulos.



INFECCION DE UN PELO RADICAL de una leguminosa por la bacteria *Rhizobium*. Comienza con la unión de éstas al pelo (*1*) por medio de un mecanismo característico a través del cual planta y bacterias proceden a su identificación o reconocimiento recíprocos mediante proteínas específicas. Las bacterias penetran entonces por el pelo radical a través de un conducto por donde fluyen hacia una célula interna de la raíz (*2*). La infección produce el hinchamiento y la división de la célula (*3*). El resultado es la formación de un nódulo radical constituido por una densa masa de células infectadas por la bacteria simbionte.

La existencia de una población de *Rhizobium* en el suelo aseguraba a los romanos la nodulación de las raíces y una subsiguiente fijación de nitrógeno en los nuevos campos de leguminosas. Desde entonces, ésa ha venido siendo la práctica tradicional de la rotación de cultivos, ya que el nitrógeno fijado remanente en el suelo tras un cultivo previo de leguminosas pueden utilizarlo plantas que normalmente no forman nódulos. La bacteria *Rhizobium* fue aislada en 1888 por los investigadores alemanes Hermann Hellriegel y H. Wilfarth. Quince años después, la inoculación deliberada de un suelo con bacterias cultivadas se había convertido ya en rutina agrícola. Hoy las distintas estirpes de *Rhizobium* se envasan junto con turba molida como agente portador.

La importancia de la bioquímica del nitrógeno en el metabolismo de los vegetales está fuera de toda duda. El nitrógeno entra a formar parte de múltiples compuestos biológicos. Constituyente esencial de las proteínas, el enlace peptídico que une un aminoácido con el siguiente en estas macromoléculas está formado entre un átomo de nitrógeno y otro de carbono. Si los aminoácidos de las plantas volvieran íntegros al suelo a la muerte del organismo, los cultivos posteriores podrían reciclar la materia muerta y formar nuevas proteínas. Pero allí los aminoácidos se degradan y resuelven en amoníaco o iones nitrato (NO_3^-). Luego, las llamadas bacterias desnitrificantes transforman los nitratos en nitrógeno molecular (N_2), que vuelve a la atmósfera. Y así se completa el ciclo del nitrógeno. To-

davía más, cuando se recoge la cosecha, o cuando el agua de lluvia transporta los compuestos nitrogenados disueltos a niveles más profundos del suelo, la materia rica en nitrógeno queda físicamente separada de la capa superficial del suelo. El lavado del suelo, la cosecha y la acción de las bacterias desnitrificantes ocasionan una pérdida neta de nitrógeno fijado, que ha de restituirse al sistema si se pretende que la siembra siguiente sintetice su propia proteína para desarrollarse.

¿Cómo aumentar la actividad fijadora de nitrógeno del *Rhizobium* en las raíces de las leguminosas e incrementar así el rendimiento del cultivo? Una forma directa sería por mejora vegetal, que no requiere en absoluto de técnicas microbiológicas. Por ejemplo, aumentando el ritmo fotosintético de las plantas, a través de una selección, las bacterias de las raíces podrían fijar más nitrógeno. Combinando la mejora vegetal con técnicas microbiológicas que modifiquen el *Rhizobium* podrían obtenerse rendimientos de proteína vegetal más elevados.

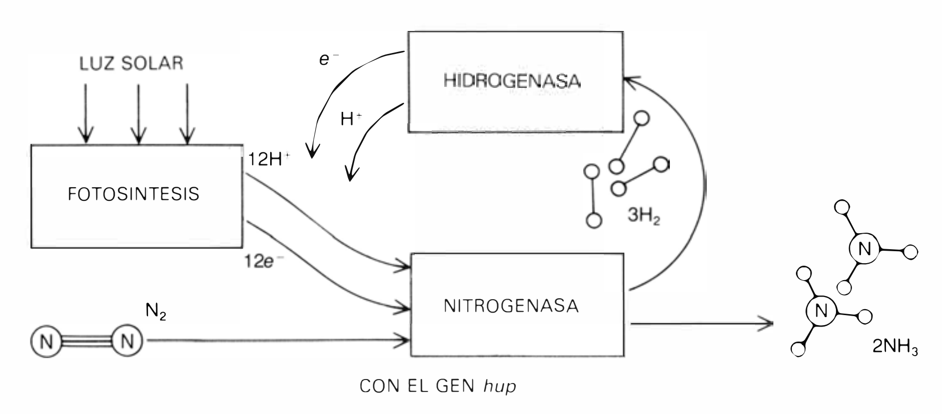
Hace unos años, mis colegas y yo, en la Universidad de Wisconsin en Madison, comenzamos a aplicar procedimientos de selección que usa la industria farmacéutica a los estudios con bacterias fijadoras de nitrógeno. Expusimos primero las bacterias a sustancias mutagénicas y a una radiación ionizante, al objeto de aumentar la tasa de mutación de la colonia. Inoculamos plantas con estas bacterias mutantes y medimos la cantidad de nitrógeno fijado por cada estirpe bacteriana. Se obtuvieron varias mutantes, capaces de conseguir niveles de fijación de nitrógeno significativamente más altos que los conseguidos por inoculantes normales. Las matas de soja del experimento alcanzaron un crecimiento superior.

El experimento se llevó a cabo en una cámara ambiental de laboratorio. Pero se supuso que valía la pena estudiar los efectos de estas bacterias mutantes sobre el crecimiento de las plantas en el campo. Para ello se plantó soja en suelos pobres en nitrógeno. Se inoculó una parcela de cada suelo con la bacteria mutante, dejando una segunda sin inocular. El resultado fue que, al final del ensayo, no se observó diferencia alguna, entre ambos tratamientos, relativa al crecimiento o al rendimiento. Se obtuvo incluso una buena cosecha de soja en la parcela control no inoculada.

Nos habíamos topado, precisamente, con lo que distingue la práctica agrícola de la industrial: el efecto que ejercen las poblaciones microbianas en el ambiente incontrolado del campo abierto. Las estirpes indígenas de *Rhizobium* formaron en ambas parcelas la mayor parte de los nódulos radicales; los mutantes incorporados, con superior capacidad de fijación de nitrógeno, no pudieron competir con el *Rhizobium* autóctono del suelo. Por otro lado, cuando se introdujeron los mutantes en suelos donde no se había cultivado leguminosas anteriormente, se obtuvieron mayores cosechas de soja. Nuestro plan actual consiste en superar esta dificultad mediante una técnica que se ha empleado tradicionalmente en la selección de variedades de plantas: pretendemos identificar las bacterias más competitivas y obtener, a partir de ellas, mutantes que posean la mayor capacidad fijadora de nitrógeno.

Inducir mutaciones al azar, para luego seleccionar las más útiles, no resulta eficaz. Los microbiólogos de algunos laboratorios se hallan investigando la genética y bioquímica de la infección por *Rhizobium*, con la mirada puesta en una modificación directa por procedimientos de ingeniería genética. En todos los organismos fijadores de nitrógeno, el agente responsable de la fijación es el enzima nitrogenasa, que cataliza la conversión de nitrógeno molecular en amoníaco. En la reacción que tiene lugar, una proteína de transporte cede electrones a la nitrogenasa; ésta, a su vez, los transfiere a la molécula diatómica de nitrógeno a través de un mecanismo que los bioquímicos no logran desvelar del todo. Tres electrones, cargados negativamente, se asocian a cada átomo de nitrógeno; luego, el medio intracelular cede tres protones (núcleos de hidrógeno) con el fin de neutralizar la carga negativa. Se producen así dos moléculas de amoníaco a partir de cada molécula diatómica de nitrógeno.

En esa transferencia de electrones, de la nitrogenasa al nitrógeno molecular, ocurre una reacción colateral simultánea que supone un desperdicio energético. En efecto, muchos de los



LA EXISTENCIA DE UN CORTOCIRCUITO BIOQUIMICO conduce a un desperdicio de gas hidrógeno (H_2), liberado como producto colateral en la reacción enzimática por la que la bacteria *Rhizobium* convierte el nitrógeno molecular (N_2) en amoníaco (NH_3). No se sabe que este hidrógeno tenga valor alguno ni para la planta, ni para la bacteria. Antes al contrario, parece un mero dispendio de la energía recabada en la fotosíntesis. La energía sirve para producir protones libres (H^+) y electrones (e^-), que a su vez dirigen las reacciones que intervienen en la fijación del nitrógeno. Si los protones y los electrones se vuelven a combinar para formar hidrógeno, la energía se disipa. Algunas cepas de *Rhizobium* disponen de un gen, situado en un plásmido, que obvia ese despilfarro. El gen, designado *hup*, permite que la bacteria sintetice el enzima hidrogenasa, enzima que cataliza la disociación del gas hidrógeno en los protones y electrones que lo constituyen, pudiendo utilizarlos entonces en la fijación de nitrógeno. Si se introduce el gen *hup* en un inoculante rizobiano se consiguen rendimientos superiores a los obtenidos con estirpes bacterianas de *Rhizobium* que no disponen de la información genética para sintetizar la hidrogenasa.

electrones se recombinan con los protones antes de alcanzar la molécula de nitrógeno, liberándose así hidrógeno molecular gaseoso (H_2). Algunas estirpes de *Rhizobium* sintetizan hidrogenasa, un enzima que desdobla otra vez ese hidrógeno en electrones y protones que puede utilizar la nitrogenasa. La hidrogenasa vendría a ser, por tanto, una suerte de reserva energética que robustecería la eficacia de la acción de las bacterias fijadoras de nitrógeno. De esta manera, el incrementado rendimiento de la bacteria permitiría a la planta en asociación encauzar su energía hacia la producción de semilla, no a atender las necesidades de su microsimbionte. Investigadores de la Universidad estatal de Oregón acaban de demostrar la eficacia del sistema hidrogenasa en el campo; han puesto de manifiesto que un cultivo de soja inoculado con una estirpe de *Rhizobium* que poseía actividad hidrogenasa rinde más que otro inoculado con *Rhizobium* carente de dicho enzima.

El equipo del John Innes Institute, de Inglaterra, ha encontrado que la hidrogenasa presente en algunas variedades de *Rhizobium* está codificada por un gen que se encuentra localizado en un plásmido, segmento de ADN separado del cromosoma bacteriano. Quizá pueda transferirse el gen responsable de la actividad hidrogenasa a aquellas estirpes de *Rhizobium* que carecen del enzima, pero que poseen otras características que las hacen interesantes como fijadores de nitrógeno.





AUMENTO DEL SISTEMA RADICAL, mediante inoculación de plántulas de pino con *Pisolithus tinctorius*, hongo del suelo que forma micorrizas. En la fotografía superior no existen hongos y el área superficial de la raíz es escasa. En la inferior, las micorrizas contribuyen a formar un sistema radical más denso, con un aumento consiguiente de superficie útil para la absorción de agua y nutrientes. Las plantas inoculadas crecen más rápidamente y gozan de mayores posibilidades de sobrevivir. Las colonias de micorrizas se propagan hacia regiones del suelo hasta donde no puede acceder el sistema radical de la planta, aumentando así el volumen de suelo que la planta puede utilizar. (Fotografías tomadas por Donald H. Marx.)

La fijación simbiótica de nitrógeno no es exclusiva del género *Rhizobium*. Ni tampoco todas las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen necesariamente que asociarse con las leguminosas. La clave para conseguir que por ingeniería genética se llegue a que los cultivos de cereales fijen nitrógeno puede estar en descifrar y comprender cuantos pormenores concurren en una simbiosis natural. Sólo se conoce un caso, del que se disponga documentación satisfactoria, en que el *Rhizobium* es capaz de nodular una planta no leguminosa; lo publicó un investigador australiano. En otro orden, se han identificado y aislado muchos otros microorganismos fijadores de nitrógeno. Así ha sucedido con *Frankia alni*, actinomicete que fija nitrógeno en simbiosis con el aliso y otras plantas no leguminosas; por cuyo motivo, el aliso puede utilizarse en rotación de cultivos, como las leguminosas, o bien en plantaciones forestales, mezclado con especies de interés comercial, tales como el abeto Douglas y el chopo.

Algunas bacterias fijan nitrógeno en el suelo sin entrar en simbiosis con un vegetal. En mi laboratorio, Stephen W. Ela y yo estamos empeñados en el siguiente proyecto: lograr que la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, a la que no se atribuyen relaciones simbióticas naturales con ninguna planta, se adhiera a las raíces de la mata de maíz para fertilizarlo. Puesto que el *Azotobacter vinelandii* sólo suele producir el amoníaco que necesita para su crecimiento, nuestro primer objetivo fue obtener mutantes capaces de producir amoníaco en exceso. ¿Cómo se conseguiría? Mediante mutantes en los que quedaran bloqueados o anulados los mecanismos metabólicos que, en células normales, denuncian un exceso de acumulación de amoníaco.

Había que lograr que sólo las plantas disfrutaran del amoníaco. La meta siguiente era, pues, que la bacteria se uniera estrechamente a las raíces de la planta. Años atrás, dos colegas míos habían transferido algunos genes de *Rhizobium* a *A. vinelandii*, consiguiendo que ésta se uniera fuertemente a las raíces del trébol. Si se introducen en *A. vinelandii* aquellos genes que determinan su adherencia a las raíces de maíz, en vez de los genes que hacen lo propio para las raíces de trébol, la planta podrá nutrirse con el amoníaco excretado por la bacteria.

En otro frente del mismo proyecto nos proponemos obtener variedades de maíz capaces de satisfacer las necesidades energéticas de la bacteria. Las plantas de maíz que hoy se cultivan en los Estados Unidos no pueden soportar una asociación con *A. vinelandii*. A través de una selección mundial de variedades de maíz, Ela ha conseguido que

aumente la producción de compuestos carbonados en las raíces, constituyendo así una mejor fuente de energía y electrones para la fijación de nitrógeno por parte de *A. vinelandii*. Hemos desarrollado variedades de maíz que recababan, de esta asociación con la bacteria, hasta el 1 por ciento quizá de su nitrógeno; los resultados obtenidos hasta la fecha son lo suficientemente prometedores como para intentar aumentar ese porcentaje.

Las plantas pueden beneficiarse de otras muchas asociaciones con microorganismos, cuyas características apenas comienzan a revelársenos. Biólogos de la Universidad de California en Berkeley han puesto de manifiesto que, añadiendo ciertas cepas de la bacteria *Pseudomonas putida* a la semilla de remolacha azucarera o a las patatas, crecía su rendimiento. Según parece, la bacteria segrega ciertos compuestos que se combinan con el hierro del suelo, convirtiéndolo en formas no asimilables por los hongos y bacterias patógenos que, a su vez, necesitan de ese elemento para su desarrollo.

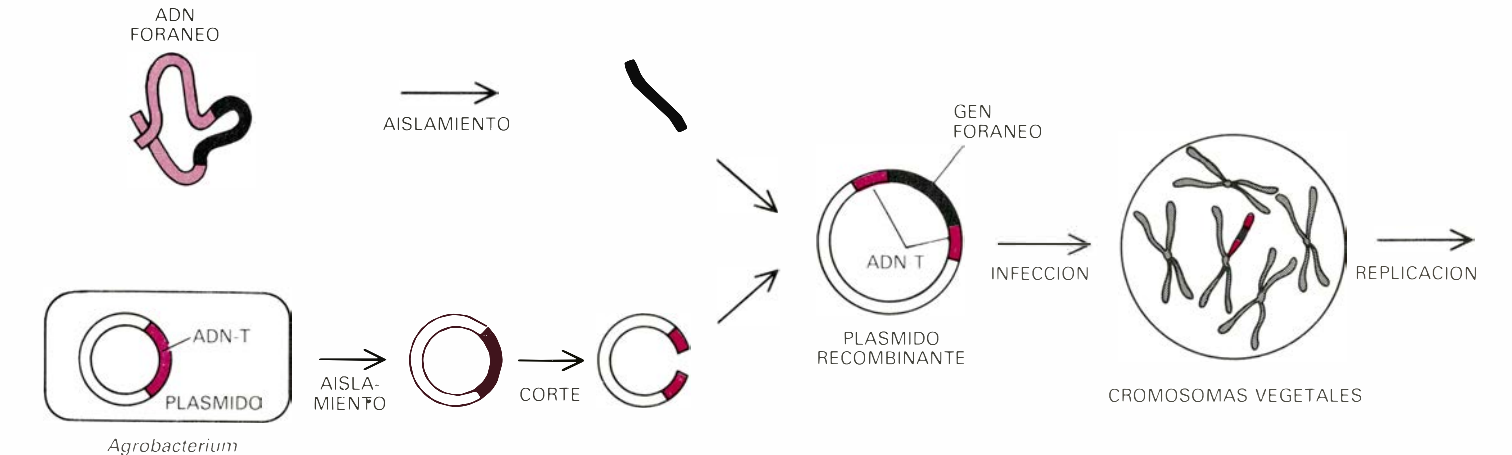
Los hongos del suelo denominados micorrizas colonizan las raíces de las plantas, constituyendo una verdadera extensión o ampliación del sistema radical. Consiguen fosfato asimilable para las plantas en suelos deficitarios de aquella sustancia, convirtiendo el fosfato a formas solubles y transportándolo hasta las raíces [véase "Micorrizas", por Concepción Azcón-G. de Aguilar y José Miguel Barea; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA; agosto de 1980]. Las micorrizas acarrean también agua hasta la planta desde puntos donde no llegan las raíces. Se ha utilizado la inoculación de plantas cultivadas sobre suelos de zonas ganadas a la minería para su explotación agrícola. Otras especies podrían adquirir, a corto plazo, una importancia considerable en silvicultura, ya que estimulan el crecimiento de especies forestales. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha trabajado mucho en la selección de aquellas clases de micorrizas que mejor convengan a una determinada planta y a unas condiciones de crecimiento específicas.

El cultivo de células vegetales individuales, o de grupos de ellas, pudiera constituir una forma de obtener productos vegetales, práctica que no se vería sometida a las oscilaciones que los rendimientos de un cultivo sufren de un año agrícola para otro, ni a las fluctuaciones del comercio internacional. Muchos productos (fármacos, pesticidas o aromatizantes) se han aislado a partir de plantas tropicales, pero podrían probablemente obtenerse a escala industrial cultivando células vegetales en grandes fermentadores. Mejor aún, las células vegetales individuales constituyen un medio muy apropiado y eficiente para desarrollar nuevas variedades de plantas. Cuando se someten esas células a un agente mutágeno y a unas condiciones críticas determinadas, aparecen rápidamente variedades adaptadas a esas condiciones, que pueden seleccionarse para el cultivo.

Si se les impone la presencia de un agente tóxico o se les priva de un nutriente esencial, sobrevivirán sólo las mutantes que, por azar, se hayan adaptado. Posteriormente, y en generaciones sucesivas, se podrá conseguir una progenie de células adaptadas específicamente a un conjunto definido de condiciones ambientales. Este método ha venido utilizándose durante mucho tiempo para seleccionar microorganismos de interés industrial; verbigracia: hongos y bacterias capaces de sintetizar agentes antibióticos resistentes a la degradación.

Una vez seleccionada la célula vegetal deseada, puede cultivarse y formar una masa de tejido desorganizado, llamada callo. A veces, las hormonas vegetales posibilitan que el callo se organice en tallos, raíces y otras partes diferenciadas de la planta. En la Universidad de Minnesota, los biólogos han desarrollado una planta de maíz resistente a las toxinas liberadas por un hongo microscópico que atacaba a las hojas de maíz, y lo lograron incorporando la toxina a un cultivo celular y seleccionando luego las células resistentes.

En muy pocos casos, sin embargo, se ha conseguido con éxito regenerar la planta a partir de células aisladas; por otro lado, no siempre las plantas regeneradas heredan las propiedades que poseía la célula seleccionada. En efecto, una célula resistente a un herbicida no origina necesariamente una planta resistente al mismo, aun cuando las células, en su individualidad, permanezcan resistentes al herbicida si se cultivan de nuevo. Más todavía: un monocultivo de células suele ser diploide o poliploide; es decir, cada célula tiene, al menos, dos copias de cada cromosoma. La información genética contenida en la célula está codificada dos veces, por lo menos. En estas circunstancias, la mayoría de las mutaciones son recesivas. El gen recesivo no actúa sobre la planta parental, pero puede manifestar



INTRODUCCION DE ADN FORANEO en células vegetales. Se puede aprovechar el proceso natural de infección llevado a cabo por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria porta un plásmido (fragmento de ADN separado del cromosoma bacteriano) que produce tumores (conocidos como agalla del cuello o cáncer vegetal, en inglés *crown gall*) en la mayoría de las plantas dicotiledóneas e induce la síntesis de unos compuestos nitrogenados llamados opinas en las células de las plantas infectadas. Se llama colonización genética al mecanismo de infección: una sección, el ADN de transferencia, o ADN-T, del plásmido se combina con el ADN cromosómico del núcleo de la célula vegetal. El plásmido podría utilizarse, pues, como vector para la inser-

su presencia en las generaciones sucesivas. En consecuencia, las características de la progenie no pueden definirse con certeza. Recientemente se ha empezado a cultivar células haploides, que sólo encierran una copia de cada cromosoma, lo que en el futuro podría facilitar la detección de mutantes.

Al separar las paredes de una célula vegetal utilizando ciertos enzimas, aparece la célula desnuda: el protoplasto. Podemos hacer que dos protoplastos, procedentes cada uno de ellos de células no relacionadas, se fusionen, creándose una nueva célula capaz de regenerar una pared celular y multiplicarse en una solución nutritiva. En cierto modo, el proceso equivale al de una reproducción sexual entre diferentes especies vegetales, aun cuando no sea frecuente la formación de un híbrido. En el Instituto Max Planck de Biología de Tübingen se consiguió la fusión de protoplastos procedentes de tomate y patata, con posterior obtención de un híbrido vegetal al que se le dio el nombre de pomate. La planta de pomate es, sin embargo, estéril; no forma patatas en el suelo ni tomates en los tallos.

La transferencia de genes de un organismo a otro representa uno de los métodos más refinados que emplea la microbiología en beneficio de la agricultura, si bien se trata del más rezagado de los tres que hemos mencionado. La verdad es que, si se compara con los métodos desarrollados para trabajar con genes animales utilizando ADN recombinante, el trabajo realizado con genes vegetales deja bastante que desear. Sin embargo, los principios en que se basa la inserción de genes foráneos son los mismos, independientemente de que las células sean de origen vegetal, animal o bacteriano.

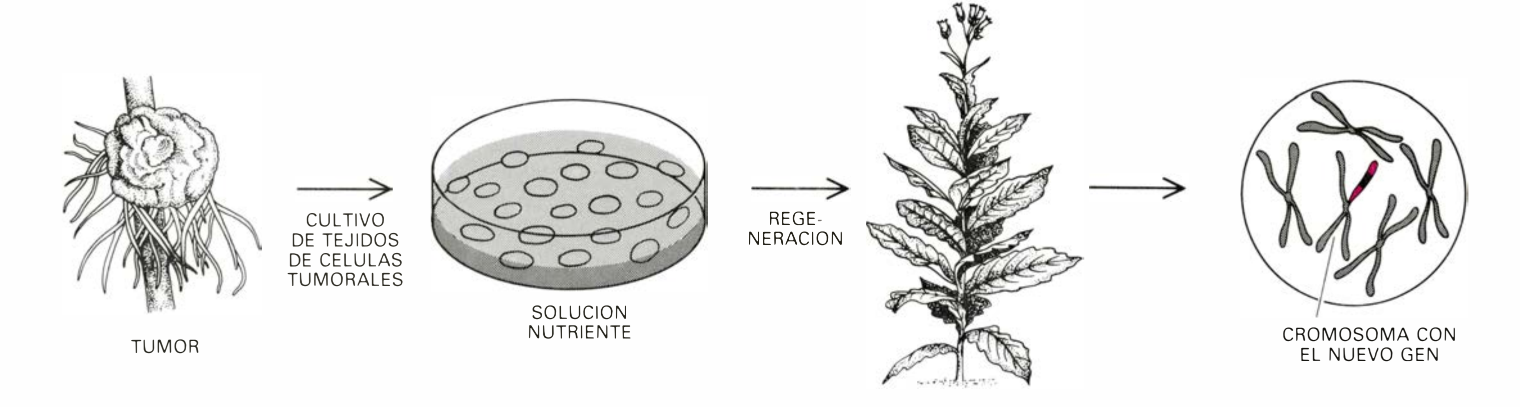
Para insertar un gen vegetal en una bacteria hay que aislarlo por medio de ciertos enzimas: las endonucleasas de restricción. El gen en cuestión debe ser introducido en la célula hospedante sirviéndonos de un plásmido o un virus como vector. De esta forma se ha conseguido, en muchos laboratorios, introducir genes vegetales en la bacteria *Escherichia coli*. La introducción con éxito de un gen foráneo en una célula no siempre va acompañada de la expresión de la proteína que codifica el gen. Para que se expresen las proteínas, ha de ponerse en movimiento, además, un proceso químico intracelular que no se conoce todavía con precisión.

Si los microbiólogos pudieran expresar las proteínas vegetales en las bacterias, aquéllas podrían obtenerse cultivando éstas en tanques de fermentación. El proceso podría, en principio, avanzar un paso más. Existen numerosos productos de origen vegetal, como fármacos, pesticidas, aceites, ceras y agentes aromatizantes, que los sintetizan las plantas en reacciones químicas secuenciales con la intervención de enzimas. Si pudieran expresarse en bacterias los genes de cada uno de los enzimas que intervienen en la síntesis de un compuesto vegetal, la bacteria podría convertirse en una verdadera fábrica.

Un objetivo de mucho mayor alcance sería conseguir la introducción de genes en células vegetales. Se han explorado con ese fin algunas posibilidades. El método que aparece más prometedor se centra en la utilización de un plásmido hallado en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria induce la formación de tumores, llamados agallas, o cáncer vegetal (*crown gall*), en heridas practicadas en dicotiledóneas, la vasta clase de plantas fanerógamas que incluye las leguminosas, el tomate y múltiples plantas más de cultivo (pero no los cereales). El mecanismo de la infección bacteriana se basa en la inserción de un segmento de su plásmido dentro de un cromosoma de las células vegetales. Al segmento insertado se le denomina ADN de transferencia, o ADN-T.

La inserción del ADN-T constituye, pues, una forma natural de modificación genética. Dota a las células vegetales infectadas de propiedades poco corrientes, determinantes, probablemente, de la formación de los tumores. Las células normales proliferan en cultivo sólo en presencia de hormonas de crecimiento vegetal, que no las precisan las células infectadas por *A. tumefaciens*. En la independencia de estas células respecto de un control hormonal puede estar la causa del crecimiento anormalmente rápido del tumor. Las células infectadas fabrican opina sintetasa; este enzima cataliza, en la célula vegetal, la síntesis de sustancias ricas en nitrógeno, llamadas opinas, utilizadas al parecer por *A. tumefaciens* como fuente de dicho elemento. De todo ello cabe deducir que el cáncer vegetal es el resultado de una estrategia biológica desarrollada por la bacteria para asegurar el nitrógeno necesario para su crecimiento.

En la Universidad de Leiden se ha conseguido infectar células cultivadas de tabaco con *A. tumefaciens*. Los autores del ensayo han observado que las



ción de ADN foráneo en células vegetales. Se parte el plásmido en un punto dentro del ADN-T y se deja un espacio libre, que es ocupado por el gen foráneo. El ADN-T se replica cuando tiene lugar la división de las células tumorales, y, así, las células tumorales mantenidas en un cultivo de tejidos continúan portando el ADN-T. En algunos casos se ha conseguido regenerar la planta a partir de las células tumorales cultivadas: el ADN-T persiste en los cromosomas de la planta regenerada. Más aún, el gen contenido en el ADN-T que codifica para el enzima opina sintetasa pasa a las plantas hijas como si fuera un simple gen dominante. Si los genes foráneos insertados en el ADN-T se transmitieran a la progenie, podrían obtenerse nuevas variedades de plantas.

plantas de tabaco regeneradas a partir de las células infectadas conservaban el ADN-T y continuaban fabricando opina sintetasa. Más recientemente, personal adscrito al Instituto Max Planck de Mejora Vegetal de Colonia han demostrado que el gen que codifica la expresión de la opina sintetasa se transmite, vía seminal, de generación en generación. Estos resultados permiten abrigar la esperanza de que, si se introducen genes foráneos en el plásmido de *A. tumefaciens*, en asociación con el ADN-T, se puedan expresar como proteínas en la planta adulta y se transfieran a la descendencia.

También se trabaja en otra línea dentro del marco común de la introducción de ADN extraño en células vegetales. Nos referimos al método que se sirve del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El ADN de este virus vegetal puede aislarse e introducirse en un plásmido para su inserción en la bacteria *E. coli*. Una vez allí, el ADN puede amplificarse, o reproducirse muchas veces, reteniendo este ADN amplificado la capacidad de infectar la coliflor y plantas afines. El estado actual de la investigación se halla en la fase de determinar qué sitios del ADN vírico son los más apropiados para introducir los genes foráneos.

Si se pudieran introducir genes a voluntad en células vegetales, hallaríamos una aplicación muy importante en la inserción de los responsables de la fijación de nitrógeno (genes *nif*) en cereales. Un equipo de la Universidad de Sussex ha conseguido ensamblar un plásmido bacteriano que porta los 17 genes *nif* conocidos de la bacteria fijadora de nitrógeno *Klebsiella pneumoniae*. Al transferir el plásmido a *E. coli*, esta bacteria, que es incapaz, en condiciones normales, de fijar nitrógeno, se convirtió en un microorganismo fijador de dicho elemento.

Más prometedores si cabe son los recientes éxitos que se han apuntado ciertos grupos de trabajo de la Universidad Cornell, Instituto Pasteur y Universidad de París, quienes han conseguido introducir en levaduras los 17 genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*. Hay que tener en cuenta que las levaduras son organismos eucarióticos, a diferencia de las bacterias, que son procarióticos; por cuya razón, las levaduras guardan una relación mucho más estrecha con las plantas superiores. De ahí que, la introducción de genes *nif* en células de levadura señale el franqueo de una importante barrera biológica.

No obstante, las células de levadura portadoras de los genes *nif* no expresaban el ADN insertado, es decir, no fueron capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera. Este fracaso ilustra la complejidad de la ingeniería genética de las funciones biológicas localizadas en más de un gen. El ADN transferido debe, primero, ser transcrito correctamente a ARN por la levadura. Una transcripción correcta no es un asunto sencillo, ya que la levadura ha de interpretar de un modo preciso las señales bacterianas para iniciar la transcripción y para detenerla. El ARN ha de salir luego del núcleo y deben reconocerlo los ribosomas como ARN mensajero para su traducción a proteína. Las 17 proteínas que expresan los genes *nif* tienen entonces

INSERCION DE GENES PARA LA FIJACION DE NITROGENO en el genoma de una levadura. Se ha logrado mediante un proceso que comprende dos etapas. En la primera, se rompen, o abren, plásmidos de la bacteria *Escherichia coli* y una célula de levadura y se unen luego para formar un único plásmido híbrido. La célula de levadura reconoce al plásmido híbrido y lo integra en su ADN cromosómico. En la segunda etapa, se aíslan del cromosoma de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, un organismo fijador de nitrógeno, los genes que se pretende introducir en la levadura. Los genes, que se designan en su conjunto *nif*, codifican unas 17 proteínas. Se corta otro plásmido de *E. coli*, y en él se introducen los genes *nif* aislados. Se dispone así de un segundo plásmido híbrido. Como se encuentra ya ADN bacteriano insertado en uno de los cromosomas de la levadura, ésta reconoce al plásmido híbrido de *E. coli*, quedando entonces este plásmido integrado en el cromosoma de la levadura. El experimento fue realizado por Aladar A. Szalay y sus colaboradores, en la Universidad de Cornell. Aun cuando la inserción de los genes *nif* de un organismo procariota en células eucariotas de levadura demuestra que se puede transferir material genético entre diferentes sistemas biológicos, en el caso que nos ocupa no se ha conseguido que el gen se exprese. En eucariotas, la mera presencia de un gen no asegura su correcta transcripción y traducción.

que funcionar conjuntamente en el citoplasma de la célula de levadura. Pero pueden haber impedimentos a tal funcionamiento. Por ejemplo, la molécula de nitrogenasa encierra en su estructura un gran número de átomos de hierro. Es evidente que la bacteria fijadora de nitrógeno tiene suficiente hierro a su disposición, pero no es seguro que la célula vegetal haga frente a una intensa demanda de ese elemento sin perjudicar la síntesis de otros enzimas esenciales para la planta.

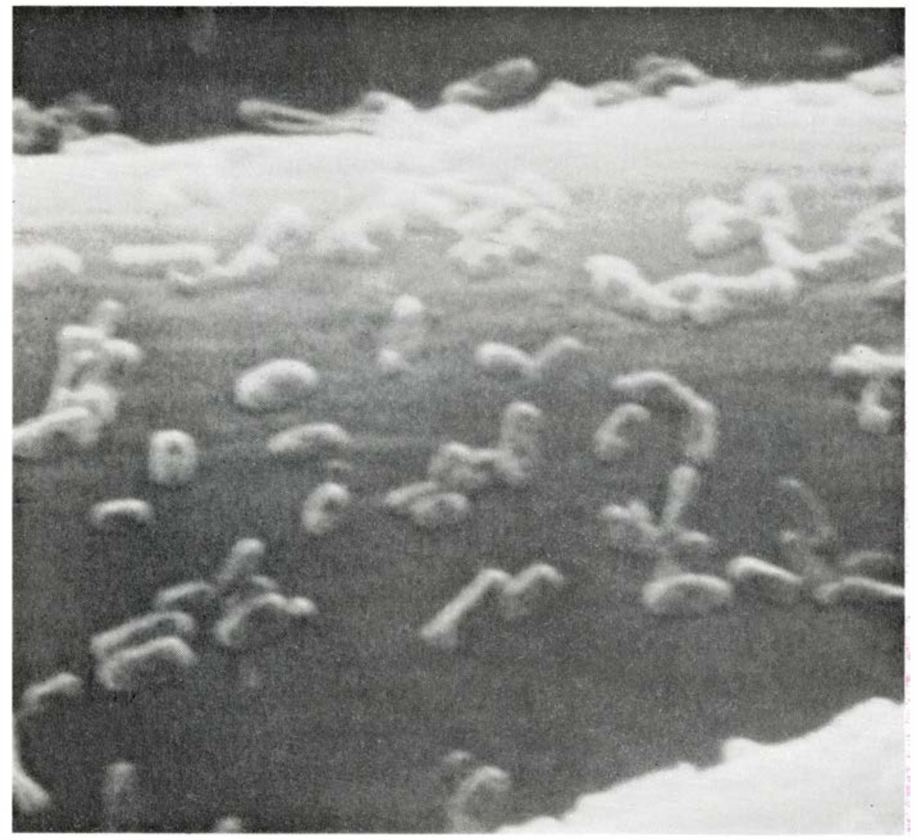
Dudas de este tipo pueden surgir, aun cuando a primera vista parezca que la expresión de una determinada función de la planta sólo necesite de un gen. Otro objetivo importante de la investigación agrícola es mejorar la calidad nutritiva de los alimentos. En este sentido, las proteínas almacenadas en algunas semillas son deficitarias en aminoácidos esenciales para la nutrición humana y animal. Se creyó durante cierto tiempo que la inserción de un gen que codificase un mejor equilibrio de la composición de aminoácidos de una proteína bastaría para elevar la calidad de ésta. Hoy se sabe que las proteínas más importantes de la semilla son, con frecuencia, conjuntos de numerosas proteínas afines, codificada cada una de ellas por un gen distinto. Para conseguir una mejora en la calidad proteica habría que modificar, quizás individualmente, muchos de los genes.

Aunque este tipo de problemas técnicos pueden ser difíciles de superar, no constituyen, con todo, el factor limitante en la aplicación de la microbiología a la agricultura. La restricción mayor a largo plazo viene de la inversión económica, relativamente baja, encauzada hoy hacia la investigación agraria, así como de la pérdida de caracteres genéticos irremplazables del acervo compartido por la especie.

Según un análisis presupuestario realizado por la Fundación Nacional de Ciencia de los Estados Unidos, el apoyo federal a la investigación en todo el espectro de las ciencias agronómicas, durante el año fiscal de 1977, fue de 206 millones de dólares, lo que supone el 2,3 por ciento de los 8800 millones de dólares gastados por el gobierno federal en ese año para toda la investigación, básica y aplicada. En el presupuesto del presidente Reagan para 1982 se adjudican 691 millones de dólares al Departamento de Agricultura, un 5,3 por ciento del total de 13.100 millones propuesto para toda la investigación básica y aplicada en 1982. De ésta, sin embargo, sólo una pequeña fracción se destinará a estudios para la aplicación de la microbiología a la agricultura; como botón de muestra, el Programa de Ayudas para la Investigación del Departamento de Agricultura administrará 26 millones de dólares para investigación básica en fijación de nitrógeno, fotosíntesis, mecanismos genéticos para la mejora vegetal, situaciones de presión ambiental y crecimiento vegetal y necesidades de la nutrición humana. El área de la microbiología recibirá solamente 4,8 millones de dólares. De todas las investigaciones con ADN recombinante dirigidas por el Instituto Nacional de la Salud, las ayudas federales para ingeniería genética aplicada a la agricultura se redujeron a 1 millón de dólares en el año fiscal de 1980, frente a los 24,5 millones concedidos a la investigación médica y los 27,5 millones para investigaciones generales.

La destrucción acelerada del bagaje genético de que se dispone actualmente resulta paradójica por partida doble. Se debe, principalmente, a la conversión de la pluviselva tropical en campos de cultivo. Y, además, está ocurriendo en el alba de una era en que tal riqueza genética, hasta ahora un fondo relativamente inaccesible, adquiere ya un elevado valor inmediato. Se estima que el ritmo de extinción anual alcanza la cifra de 1000 especies, que no puede contrarestar el tímido esfuerzo organizado que se realiza para mantener reservas genéticas.

El microbiólogo será sólo un trabajador más de los muchos que participarán en el desarrollo de nuevos cultivos y prácticas agrícolas. Importa mucho que trabaje en estrecha colaboración con los agrónomos y especialistas en mejora vegetal, no sólo por la experiencia que éstos tienen sobre los efectos de las modificaciones que se realizan con los cultivos, sino, también, porque muchas de las técnicas de ambas disciplinas se solapan. Cabe presumir que, a medida que se vaya avanzando, surjan nuevas fronteras que superar en la aplicación de la microbiología a la agricultura, obstáculos que no serán infranqueables ni harán inviable la puesta en práctica de los logros de la investigación.



BACTERIAS BENEFICIOSAS adheridas a las raíces de una planta de remolacha, según se aprecia en esta micrografía de barrido realizada por Trevor S. Suslow y Douglas G. Garrott, de la Universidad de California en Berkeley. La bacteria *Pseudomonas putida* impide el crecimiento de otros microorganismos en las proximidades de la raíz, gracias a su capacidad de extraer hierro del suelo. El hierro, al quedar fuertemente unido a moléculas sintetizadas por la bacteria simbiótica, no llega a hongos y otras bacterias del suelo que podrían dañar las raíces de la planta. Con ello se reduce el número de microorganismos que podrían competir en el consumo de los nutrientes, y se consiguen mayores rendimientos en la producción.

Inhibidores de biosíntesis de proteínas

Un grupo numeroso de antibióticos y polímeros naturales usados en terapéutica o en investigación biológica son inhibidores específicos del proceso de la traducción

David Vázquez

En los artículos que han precedido, los autores se han ocupado de la síntesis, a escala industrial, de determinadas sustancias, proteínas sobre todo. ¿Qué decir del posible bloqueo de esa producción?

Un efecto inhibidor específico en biosíntesis de proteínas por cloranfenicol y clortetraciclina a sus concentraciones inhibidoras mínimas fue descrito ya por Gale y Paine en 1950, cuando observaron que dichos antibióticos causaban un bloqueo inmediato de la síntesis de proteínas en bacterias y un aumento en la cantidad de ARN sin afectar la respiración, ni la fermentación, ni la acumulación de aminoácidos. Trabajos que revelaran efectos similares en células superiores tardaron ocho años en aparecer, cuando David Kerridge describió, en 1958, el efecto inhibidor de la cicloheximida en la biosíntesis de proteínas en levaduras. A partir de 1961 se desarrollaron los sistemas acelulares para estudiar la biosíntesis de las proteínas, así como los métodos adecuados para investigar las distintas reacciones que tienen lugar en el proceso de la traducción. Desde entonces acá se han ido elucidando los pasos específicos bloqueados por los distintos inhibidores.

La mayoría de los inhibidores de la biosíntesis de proteínas, y ciertamente los de mayor interés en biología y en medicina, son antibióticos que actúan bloqueando específicamente el proceso de la traducción del ARNm a nivel del ribosoma. Se llama traducción a la conversión de la secuencia de nucleótidos de una molécula en ARNm en una secuencia correspondiente de aminoácidos de una cadena polipeptídica. En el estudio de la traducción podemos considerar al menos dos tipos de sistemas: sistemas procarióticos (los de bacterias, algas azules, mitocondrias y cloroplastos) y sistemas eucarióticos (los del citoplasma de las células superiores). En la mayoría de los casos, los distintos componentes de los diversos sistemas procarióticos son intercambiables entre sí. Asimismo, los diferentes componentes de los sistemas eucarióticos suelen ser también intercambiables entre sí.

Los ribosomas mejor estudiados de los sistemas procarióticos son los de bacterias. Al igual que los ribosomas de algas azules y de cloroplastos, tienen un coeficiente de sedimentación 70S y están formados por dos subunidades de coeficientes de sedimentación 30S y 50S, que se unen en la fase de iniciación del proceso de la traducción [véase "El ribosoma", por James A. Lake, Investigación y Ciencia, octubre de 1981]. Por ello, al referirnos a los ribosomas de sistemas procarióticos los mencionaremos también como ribosomas de tipo procariótico o 70S, aun a sabiendas de que su coeficiente de sedimentación puede ser en algunos casos muy diferente, como ocurre con los ribosomas de mitocondrias, que varían desde 55S hasta 80S, según su procedencia. Por el contrario, los ribosomas del citoplasma de las células superiores tienen un coeficiente de sedimentación 80S, o muy próximo a este valor, en todos los casos estudiados; están formados por dos subunidades, cuyo coeficiente de sedimentación es 40S y 60S, respectivamente. Al referirnos a los ribosomas de sistemas eucarióticos frecuentemente los mencionaremos, pues, como ribosomas de tipo 80S o eucariótico. Interesa destacar que la subunidad mayor de los ribosomas de mitocondrias de hongos, protozoos y animales superiores carece del ARN 5S presente en la subunidad mayor de los demás tipos de ribosomas procarióticos y eucarióticos. Los ribosomas de bacterias poseen 54 proteínas; de las cuales, 33 están en la subunidad mayor (proteínas *L*) y 21 en la subunidad menor (proteínas *S*). Los ribosomas del citoplasma de células superiores tienen 70 proteínas; 40 de ellas se hallan en la subunidad mayor (proteínas *L*) y 30, en la subunidad menor (proteínas *S*).

Nuestros estudios iniciales sobre la localización del cloranfenicol marcado con carbono radiactivo 14, en las bacterias, mostraron que el antibiótico se unía a los ribosomas de todos los tipos de sistemas procarióticos estudiados, y en ningún caso a los ribosomas eucarióticos. Una selectividad similar se observó posteriormente con una serie de antibióticos, mientras que otros ofrecían un espectro más amplio. Y puesto que hemos partido de la existencia de dos tipos de sistemas de biosíntesis de proteínas, procarióticos y eucarióticos, que participan de múltiples características aunque difieren en muchos aspectos y componentes, sus inhibidores podrán clasificarse, de una manera global, en razón de su selectividad: los que actúan sólo en sistemas procarióticos, los inhibidores exclusivos de sistemas eucarióticos y, finalmente, los que intervienen tanto en sistemas procarióticos como en sistemas eucarióticos. El conocimiento del modo de acción de estos inhibidores es de gran interés para el esclarecimiento del proceso de la traducción y la mejor comprensión de la estructura del ribosoma. El proceso de la traducción ocurre con precisa exactitud; se estima que hay menos de un aminoácido incorporado erróneamente por cada diez mil unidos, a través de enlaces peptídicos, por el ribosoma de acuerdo con la secuencia de bases del ARNm. Resulta de gran importancia, además, estudiar los inhibidores que actúan en sistemas procarióticos, puesto que la mayoría de ellos son antibióticos que tienen interés médico.

En el proceso de la traducción podemos distinguir la fase de iniciación, los ciclos repetidos de elongación y la fase de terminación. En la fase de iniciación se requieren las dos subunidades ribosómicas, el sustrato iniciador (formilmetionil-ácido ribonucleico de transferencia, o f-Met-$ARNt_F$, en sistemas procarióticos y Met-$ARNt_F$ en sistemas eucarióticos), GTP, ARNm y diversas proteínas conocidas con el nombre de factores de iniciación (FI-1, FI-2 y FI-3 en bacterias; en sistemas eucarióticos: ESP, eFI-1, eFI-2, eFI-3, eFI-4A, eFI-4B, eFI-4C, eFI-5, la proteína requerida específicamente para la interacción del terminal 5' del ARNm y quizás algunos otros descritos recientemente).

Hay una sola fase de iniciación por cada cadena proteica que se sintetiza. En ella distinguimos tres pasos, al menos: consiste el paso *a* en el reconocimiento de los factores de iniciación y fijación del sustrato iniciador (f-Met-ARNt en sistemas procarióticos y Met-ARNt, en eucarióticos) a la subunidad ribosómica menor (30S en bacterias y 40S en sistemas eucarióticos); el *b*, en el reconocimiento del triplete nucleotídico iniciador del ARNm; el paso *c* está constituido por las reacciones finales de la iniciación que determinan la formación del complejo de iniciación en el ribosoma de tipo 80S o 70S. En algunos sistemas eucarióticos, el paso *b* abarca dos reacciones; en la reacción b_1, hay una interacción, con la subunidad ribosómica menor, de las secuencias nucleotídicas de ARNm anteriores al triplete de bases iniciador (AUG), mientras que en la reacción b_2 tiene lugar el reconocimiento del AUG iniciador del ARNm. El paso *c* implica las reacciones c_1, en que la subunidad ribosómica mayor (50S en bacterias y 60S en sistemas eucarióticos) se une al complejo de iniciación formado en la subunidad ribosómica menor, y c_2, en que el terminal 3' del sustrato iniciador se une al sitio donador del centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor. De acuerdo con la hipótesis más ampliamente aceptada, las interacciones codón-anticodón del ARNm y del sustrato iniciador no sólo se dan a nivel del sitio *A*, sino también a nivel del sitio *P* de la subunidad menor del ribosoma.

En los últimos años se ha observado una importante característica en el extremo terminal 5' de los ARNm de algunos sistemas eucarióticos: se trata de la secuencia 5' terminal metilada m^7 G (5') ppp..., denominada "cap", no detectada nunca en los ARNm de bacterias, aunque sí descrita en algunos ARNm que se traducen en distintas células humanas, en células de mono y de ratón y en virus vacunal, SV 40, reovirus y virus de la estomatitis vesicular. En estos ARNm, el $m^7 G^{5'}$ p del extremo terminal 5' es esencial para una mayor eficacia de la traducción; participa en el paso b_1 anteriormente reseñado. Por ello, la presencia de dicho terminal 5' estimula la eficacia, pero no la especificidad de la traducción.

Se ha demostrado que un ribosoma puede cubrir, por su tamaño, unos doce tripletes del ARNm, aunque en el proceso de su lectura solamente haya interacciones codón-anticodón de dos tripletes. De ahí que, en un ribosoma implicado en la traducción, se lean unos doce tripletes antes de que se una otro ribosoma al ARNm, y así sucesivamente hasta formar un polisoma, en el que diversos ribosomas están leyendo un mismo ARNm con un desfase de dicho número de tripletes entre los ribosomas más próximos.

Los inhibidores de la traducción, clasificados dentro del grupo que bloquea específicamente la iniciación, pueden caracterizarse por cumplir las siguientes normas: en primer lugar, inhibir preferentemente la síntesis de polipéptidos dirigida por ARNm natural, sin afectar apenas la incorporación de aminoácidos dirigida por polinucleótidos sintéticos sin iniciación fisiológica. Segundo, permitir la síntesis de cadenas polipeptídicas cuya iniciación ya tuvo lugar cuando se añadió el inhibidor; la síntesis del polipéptido continúa hasta finalizar la cadena; sólo se bloquea el proceso cuando se reinicia la síntesis de una nueva cadena polipeptídica. Tercero, y a modo de consecuencia de lo anteriormente indicado, los inhibidores de iniciación causan rotura de los polisomas, puesto que permiten la lectura del ARNm por los ribosomas que ya están traduciendo cuando se añade el inhibidor y, finalmente, se liberan los ribosomas al terminar el proceso de lectura. Cuarto, no bloquean ninguno de los pasos de la elongación ni de la terminación en sistemas resueltos. En quinto lugar, inhibir alguno de los pasos de la fase de iniciación estudiados usando los distintos factores requeridos en la misma y las subunidades ribosómicas lavadas con alta concentración de sales.

Las reacciones iniciales del paso *a* (que consistía en el reconocimiento de los factores de comienzo y fijación del sustrato iniciador a la subunidad ribosómica menor) no se han podido estudiar aisladamente en sistemas de bacterias. En sistemas de eucariotas, por contra, se ha esclarecido la existencia de dos reacciones, al menos, en dicho paso: en la primera tiene lugar la formación del complejo eFI-2-Met-$ARNt_F$-GTP y, en la segunda, este complejo se une al ribosoma. En sistemas eucarióticos se conocen diversos inhibidores de la primera reacción: showdomicina, ácido aurintricarboxílico, violeta de pirocatecol, adrenocromo y sulfato de polidextrano. Estos inhibidores sirven para esclarecer los distintos pasos de la traducción, aunque muestren poca especificidad. Así, la showdomicina, por ser un análogo de maleimida, no sólo bloquea el factor

ORGANISMOS Y ORGANULOS	RIBOSOMA	SUBUNIDAD MENOR		SUBUNIDAD MAYOR	
		COMPLETO	ARN RIBOSOMICO	COMPLETO	ARN RIBOSOMICOS
BACTERIAS	70S	30S	16S	50S	5S y 23S
ALGAS AZULES	70S	30S	16S	50S	5S y 23S
CLOROPLASTOS	70S	30S	16S	50S	5S y 23S
MITOCONDRIAS DE HONGOS	70-75S	30-40S	12S	50S	16S
MITOCONDRIAS DE PROTOZOOS	80S	50S	16S	55S	23S
MITOCONDRIAS DE ANIMALES SUPERIORES	55-80S	30-35S	16S	40-45S	23S
MITOCONDRIAS DE VEGETALES SUPERIORES	77-80S	40S	16S	60S	5S y 23S
CITOPLASMA DE CELULAS EUCARIOTICAS	80S	40S	18S	60S	5S, 5,8S, 28S
ARCHIBACTERIAS	70S	30S	16S	50S	5S y 23S

COEFICIENTES DE SEDIMENTACION de ribosomas y ARN ribosómicos de microorganismos procarióticos (bacterias, algas azules y archibacterias), orgánulos celulares de tipo procariótico (mitocondrias de hongos, protozoos, animales superiores y vegetales superiores) y, también, de células eucariotas.

eucariota eFI-2, sino los distintos enzimas en los que los grupos -SH tienen un papel esencial. Los colorantes trifenilmetánicos (ácido aurintricarboxílico y violeta de pirocatecol), el adrenocromo y el sulfato de polidextrano inhiben la formación del complejo eFI-2-Met-ARNt$_F$-GTP y, además, el paso b_1 en sistemas tanto de bacterias como de células superiores. Su uso está prácticamente restringido a sistemas acelulares, debido a su difícil permeabilidad en células intactas.

Se conocen, por otra parte, varios inhibidores de la formación del complejo eFI-2-Met-ARNt$_F$-GTP, de gran importancia fisiológica, como son el inhibidor traduccional (el represor controlado por la hemina), el ARN de doble banda y el interferón. El inhibidor traduccional se comenzó estudiando en reticulocitos de conejo y se denominó represor controlado por la hemina, al poseer estas características. Se demostró que un inhibidor traduccional similar estaba ampliamente representado en los distintos tipos de células eucarióticas: se caracteriza por poseer una actividad kinasa (activadora) independiente del AMP cíclico y que opera fosforilando el factor eucariota eFI-2.

El ARN de doble banda interfiere la función del factor eucariota eFI-2 e inhibe así la formación del complejo eFI-2-Met-ARNt$_F$-GTP en células tanto normales como infectadas por virus. A su vez, el ARN de doble banda induce la formación de unas glicoproteínas específicas, conocidas genéricamente con el nombre de interferón, y aumenta los efectos de éste en las células infectadas por virus. El interferón inhibe la multiplicación de virus sensibles bloqueando el proceso de traducción. Sin embargo, la potenciación de efectos entre el ARN de doble banda y el interferón es un fenómeno muy complejo, en el que se hallan implicadas una serie de reacciones, cuya relación entre sí no se conoce del todo: inducción de fosforilación de algunas proteínas, inducción de actividad nucleasa que degrada al ARNm, inactivación de ciertos ARNt y producción de un inhibidor de la traducción cuya estructura en ciertas células se ha identificado como ppp A2'p5'A2'p5'A.

El antibiótico kasugamicina es, realmente, el único inhibidor específico del paso *a* que bloquea la interacción del sustrato iniciador, en bacterias y en células eucariotas. Aunque este antibiótico se usa como antifúngico en agricultura, su modo de acción se ha estudiado principalmente en sistemas bacterianos. Interacciona con la subunidad ribosómica 30S bloqueando la unión del f-Met-ARNt$_F$ a esta subunidad. En mutantes de *Escherichia coli* resistentes al antibiótico, la resistencia se debe a una deficiencia en la metilación de dos residuos adyacentes de adenina, que no se presenta en el ARN de 16S de la subunidad ribosómica 30S de la cepa resistente.

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS PROCARIOTICOS		INHIBIDORES DE QUE ACTUAN EN SIST
Altiomicina	Antibióticos macrolidos:	Abrina
Antibióticos aminoglicosídicos:	Grupo de la carbomicina:	Acido ciclopiazónico
Dihidroestreptomicina	Carbomicinas	Acido tenuazónico
Estreptomicina	Josamicina	Alfa sarcina
Avilamicina	Leucomicinas	Anisomicina
Berninamicina	Nidamicinas	Antiamebina
Botromicina A_2	Grupo de la eritromicina:	Axenomicina
Grupo del cloranfenicol:	Eritromicinas	Grupo de la bruceantina:
Cloranfenicol	Neospiramicinas	Bruceantina
D-AMP-3	Oleandomicina	Holacantona
Higromicina *A*	Grupo de la espiramicina:	Crotinas
D-Tiomicetina	Angolamicina	Curcinas
D-Win-5094	Espiramicinas	Grupo de la emetina:
Cloacina *DF*13	Relomicina	Emetina
Colicina *E*3	Tilosina	Tubulosina
Espectinomicina	Grupo de la lancamicina:	Enomicina
Grupo de la estreptogramina *A*:	Chalcomicina	Fenomicina
Estreptogramina *A*	Kujimicina *A*	Fluoruro sódico
Griseoviridina	Lancamicina	Grupo de la glutarimida:
Ostreogricina *G*	Grupo de la metimicina:	Actifenol
Grupo de la estreptogramina *B*:	Forocidinas	Cicloheximida
Estafilomicina *S*	Metimicina	Estreptimidona
Estreptogramina *B*	Narbomicina	Estreptovitacina *A*
Viridogriseína	Neometimicina	Grupo de la harringtonina:
Estreptotricinas	Picromicina	Harringtonina
Grupo de la lincomicina:	Micrococina	Homoharringtonina
Celesticetina	Negamicina	Isoharringtonina
Clindamicina	Rubradirinas	
Lincomicina	Termorrubina	
	Grupo del tiostrepton:	
	Esporangiomicina	
	Siomicina	
	Tiopeptina	
	Tiostrepton	
	Grupo de la viomicina:	
	Capreomicinas	
	Viomicina	

SELECTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES DE BIOSINTESIS de proteínas según su acción en sistemas procarióticos e eucarióticos. Hay varios casos en que su actividad es menos específica. En células intactas, la edeína A_1 constituye principalmente un inhibidor de la síntesis de ADN y la cicloheximida puede

Decíamos más arriba que el paso *b*, de la única fase de iniación existente por cada cadena proteica que se sintetiza, consistía en el reconocimiento del triplete nucleotídico iniciador del ARNm. Mas dicho paso *b* no implica sólo la interacción codón del ARNm-anticodón del ARNt$_F$ a nivel de la subunidad menor del ribosoma, sino también la interacción de ciertas secuencias nucleotídicas del ARNm anteriores al triplete iniciador. Se requiere también el factor FI-3 en bacterias o diversos otros factores en eucariotas.

Los compuestos m^7 $G^{5'}$ ppp (7-metilguanosín-5'-trifosfato), m^7 $G^{5'}$ pp, m^7 $G^{5'}$ p, m^7 $G^{5'}$ pppAm, m^7 $G^{5'}$ pppCm, m^7 $G^{5'}$ pppUm se han descrito como inhibidores específicos del paso b_1, que actúan en sistemas eucarióticos que traducen un ARNm provisto de m^7 $G^{5'}$ ("cap") en su parte terminal 5', interfiriendo con la interacción de los nucleótidos del ARNm anteriores al triplete iniciador. Trabajos recientes han mostrado que estos análogos del "cap" también interfieren en la fase de iniciación en la traducción de los ARNm que no poseen "cap" en el terminal 5', aunque su efecto inhibidor parece ser menor.

El antibiótico edeína A_1 resulta muy apto para el estudio de la fase de iniciación en sistemas acelulares de bacterias o células superiores, pero no en bacterias intactas, puesto que, en este caso, constituye un inhibidor muy eficaz de la replicación del ADN; su actividad en biosíntesis de proteínas sólo se manifiesta a concentraciones más elevadas.

LA TRADUCCION EMAS EUCARIOTICOS	INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS PROCARIOTICOS Y EUCARIOTICOS	
Grupo de la licorina:	A201A	Guanilil-metilen-difosfato
Licorina	Acido aurintricarboxílico	Guanilil-imido-difosfato
Pseudolicorina	Acido fusídico	Higromicina *B*
MDMP	Actinobolina	Nucleocidina
Grupo de la narciclasina:	Adrenocromo	Pactamicina
Hemantamina	Grupo de la amicetina:	Puromicina
Narciclasina	Amicetina	Showdomicina
Pretazetina	Bamicetina	Sulfato de polidextrano
PAP	Plicacetina	Sulfato de polivinilo
Pederina	Antelmicina	Grupo de la tetraciclina:
Ricina	Blasticidina *S*	Clortetraciclina
Antibióticos tricotecénicos:	Chartreusina	Doxiciclina
Grupo de la tricodermina:	Edeína A_1	Oxitetraciclina
Fusarenón *X*	Esparsomicina	Tetraciclina
Tricodermina	Gougerotina	Tosilfenilalanilclorometano
Tricodermol		
Tricotecina		
Grupo de la verrucarina *A*:		
Desacetoxiescirpenol		
Nivalenol		
Toxina *T*-2		
Verrucarina *A*		
Alcaloides de *Tylophora*:		
Criptopleurina		
Tilocrebrina		
Tiloforina		
Toxina diftérica		

INHIBIDORES DE LA TRADUCCION QUE ACTUAN EN SISTEMAS DE ARCHIBACTERIAS
Anisomicina
Cloranfenicol
Toxina diftérica

impedir no sólo la traducción, sino también la síntesis de ADN y ARN. Separadamente (*abajo, derecha*) se relacionan asimismo los inhibidores que hasta ahora son conocidos por bloquear la traducción en archibacterias: por ello las archibacterias se consideran microorganismos procariotas independientes.

Sin embargo, en sistemas acelulares la edeína interacciona preferentemente con la subunidad ribosómica menor y actúa en el paso *b* de la fase de iniciación, pues no permite la formación del correspondiente complejo de iniciación. En el caso de la traducción de los ARNm que tienen el terminal 5' m^7 G (5')p, la edeína A_1 no interfiere con la interacción de este terminal (reacción b_1), aunque sí bloquea específicamente el reconocimiento del AUG iniciador (reacción b_2).

El paso *c*, recordamos, está constituido por las reacciones finales de la iniciación que determinan la formación del complejo de iniciación en el ribosoma de tipo 80S (eucariotas) o de tipo 70S (procariotas). Consta de dos reacciones: c_1 y c_2. En lo referente al paso c_1, en el que tiene lugar la interacción de la subunidad ribosómica mayor con el complejo de iniciación formado en la subunidad ribosómica menor, no se ha descrito ningún inhibidor activo en sistemas bacterianos. Por el contrario, los fluoruros (sódico y potásico) y el herbicida 2-(4-metil-2,6-dinitro-anilino)-N-metil-propionamida (MDMP) se han propuesto como inhibidores específicos del paso c_1, ya que actúan de un modo selectivo en sistemas eucarióticos.

El antibiótico pactamicina actúa a bajas concentraciones en la subunidad menor de ribosomas, tanto procarióticos como eucarióticos, impidiendo la iniciación de la cadena peptídica en ambos tipos de sistemas: bloquea la colocación del sustrato iniciador en la posición correcta en el sitio donador en la subunidad mayor del ribosoma (paso c_2). A concentraciones más elevadas, el antibiótico interfiere también con la subunidad mayor del ribosoma, y por ello tiene un efecto secundario en los ciclos de la elongación de la cadena peptídica.

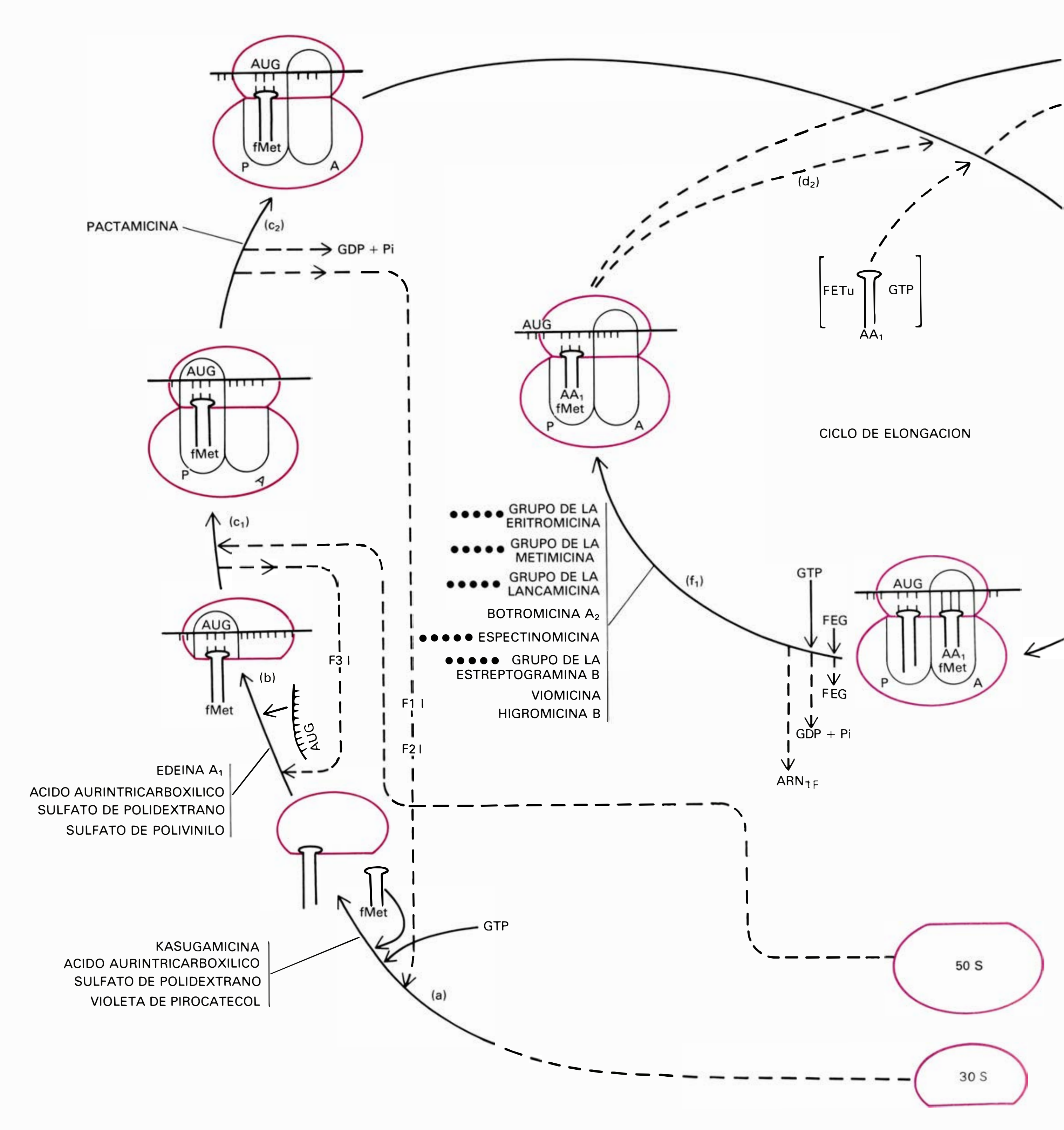
El alargamiento de la cadena peptídica tiene lugar por medio de ciclos repetidos compuestos de tres pasos secuenciales. El paso *d* consiste en la fijación de aminoacil-ARNt, dependiente de GTP y del factor FE-Tu (o FE-1); el paso *e*, en la formación del enlace peptídico catalizada por el centro peptidil transferasa, integrado en la subunidad mayor del ribosoma, y, el paso *f*, en la translocación del sustrato dependiente del factor FE-G (o FE-2). Además del complejo de iniciación formado en el paso c_2, se requieren, en el primer ciclo de elongación, dos moléculas de GTP, el aminoacil-ARNt codificado por el triplete nucleotídico correspondiente del ARNm y los factores de elongación FE-Ts, FE-Tu y FE-G en bacterias y en eucariotas, los factores FE-1 y FE-2. Hay un solo sitio de entrada del complejo aminoacil-ARNt-GTP-FE-Tu (o FE-1) en el sitio *A* del ribosoma; se precisa la hidrólisis del GTP para la separación ulterior del factor FE-Tu del ribosoma. Esta fijación fisiológica se denomina enzimática en contraposición con la fijación no enzimática, que puede llevarse a cabo en sistemas acelulares en presencia de altas concentraciones de Mg^{++} no fisiológicas.

La translocación (paso *f*) requiere uno de los factores de elongación (FE-G en bacterias y FE-2 en eucariotas) e implica el movimiento del peptidil-ARNt del sitio *A* al sitio *P* acoplado al movimiento de un triplete del ARNm en el ribosoma; se exige la hidrólisis de una molécula de GTP para la separación posterior del factor FE-G (o FE-2). En sistemas acelulares, y en ausencia de los factores de elongación y de GTP, se asiste a una lenta translocación espontánea no enzimática. Esta translocación no enzimática se acelera considerablemente en sistemas eucarióticos en presencia de elevadas concentraciones de K^+ o NH_4^+. Los dos factores de elongación que forman complejo con GTP (y ya sea FE-Tu o FE-G en bacterias o bien FE-1 o FE-2 en eucariotas) parecen interaccionar con un sitio común o superpuesto de la subunidad ribosómica mayor; por tanto, no se unen de una manera simultánea, sino alternativamente, al ribosoma. Así, la interacción de cada uno de los factores de elongación tiene lugar después de la separación del otro del ribosoma.

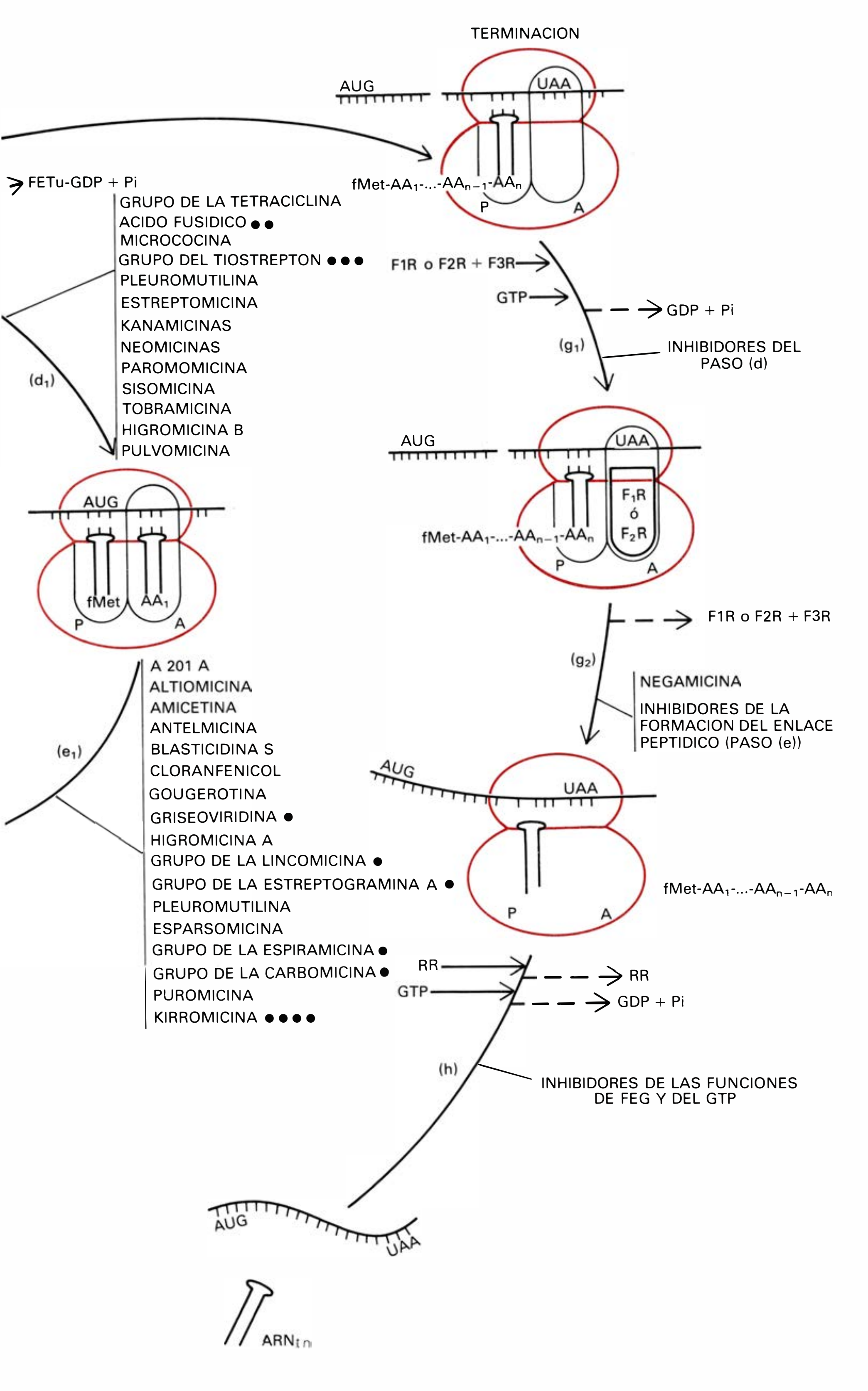
Dentro de los compuestos que interfieren con el reconocimiento del aminoacil-ARNt podemos distinguir al menos dos grupos. Abarca el primero los inhibidores de la fijación de los aminoacil-ARNt dependientes del GTP y del factor FE-Tu (o FE-1); el otro agrupa los compuestos que, por causar errores en la lectura del ARNm, bloquean

la síntesis de las proteínas, pues favorecen la interacción errónea de los aminoacil-ARNt en el sitio aceptor del ribosoma. Los antibióticos del grupo de la tetraciclina son potentes inhibidores de la fijación enzimática de aminoacil-ARNt. Estos antibióticos ofrecen numerosos sitios de interacción con ambas subunidades ribosómicas, al menos en bacterias, pero su unión con la subunidad ribosómica menor parece ser más acorde con su modo de acción. Las actividades de las tetraciclinas en células eucarióticas es muy pequeña, comparada con sus actividades en bacterias. Ello obedece a que las bacterias tienen sólo un transporte activo para estos antibióticos; se concentran, por tanto, en el citoplasma de las cepas sensibles, mientras que los mutantes resistentes a las tetraciclinas tienen una modificación en una de las proteínas de la membrana externa que impide la concentración del antibiótico en el interior bacteriano.

El ácido fusídico puede inhibir el paso de la translocación en sistemas ace-



lulares, cuando se añade en gran exceso o cuando, alternativamente, sólo se incorpora una pequeña concentración de FE-G (o FE-2) en el sistema. Esto ocurre porque se forma el complejo GTP.ribosoma.ácido fusídico. FE-G (o FE-2) y, por tanto, el antibiótico puede secuestrar todo el FE-G (o FE-2) disponible. Ahora bien, el efecto del ácido fusídico en tales sistemas es abolido por concentraciones saturantes de FE-G (o FE-2). No obstante, en células intactas y en sistemas de traducción integrados, el ácido fusídico se presenta como un verdadero inhibidor de la fijación enzimática del aminoacil-ARNt, que no puede tener lugar al formarse el complejo ribosoma.ácido fusídico. FE-G (o FE-2). GTP. Por ser estable, este complejo no permite que GTP.FE-Tu (o FE-1). aminoacil-ARNt interaccione con su sitio ribosómico que está superpuesto con el del complejo FE-G.GTP. De acuerdo con este modo de acción, se han aislado mutantes de bacterias resistentes al ácido fusídico en los que el factor FE-G está alterado y, en consecuencia, es resistente a la acción del antibiótico. Conviene destacar que, aunque el ácido fusídico tiene un espectro de acción muy amplio, se ha descrito una resistencia al antibiótico en dos tipos de sistemas: mitocondrias de hongos y bacilos en la fase específica de la formación del septum.



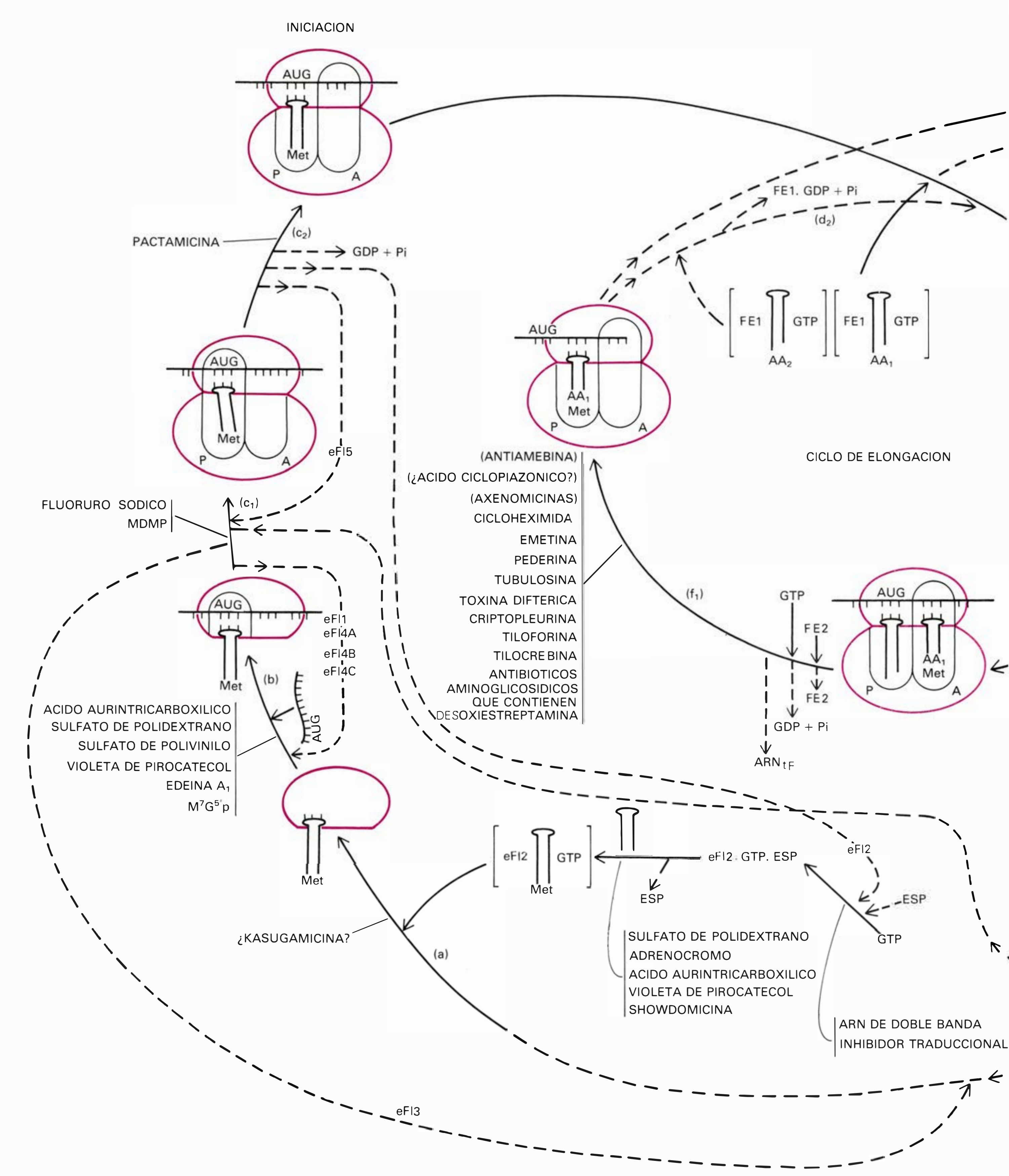
Los antibióticos del grupo del tiostrepton (tiostrepton, siomicina, esporangiomicina y tiopeptina) actúan en la subunidad mayor del ribosoma bacteriano en una localización superpuesta con el sitio *A* de dicha subunidad. Por ello, en sistemas acelulares tiostrepton bloquea la fijación (enzimática y no enzimática) de aminoacil-ARNt y la translocación. En bacterias intactas, sin embargo, al producirse la inhibición por el antibiótico, el peptidil-ARNt queda unido al sitio *P*, demostrándose así que tiostrepton permite la translocación en estas condiciones, pero inhibe la fijación de aminoacil-ARNt. Se requiere la presencia de la proteína *L*11 de la subunidad ribosómica 50S para la interacción del antibiótico con esta subunidad; el antibiótico se une de una manera específica al complejo de la proteína *L*11 con el ARN 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Por otra parte, los ribosomas de bacterias resistentes al tiostrepton carecen de la proteína *L*11 y por ello el antibiótico no puede actuar en su normal sitio de acción.

Podemos incluir los antibióticos del grupo de la kirromicina en este apartado; actúan selectivamente en sistemas eucarióticos, ya que interaccionan con el factor FE-Tu formando el complejo kirromicina. FE-Tu, que facilita la interacción del aminoacil-ARNt con el ribosoma. Este complejo, muy estable, no se separa del ribosoma; no puede ocurrir, pues, el paso siguiente, que es

PROCESO DE LA TRADUCCION en bacterias: sitio de acción de los inhibidores. Un punto a la izquierda significa que no interacciona con polisomas y sólo inhibe la formación del enlace peptídico cuando se une al ribosoma antes de formarse el polisoma. Dos puntos: requiere la presencia del factor FEG para su efecto inhibidor. Tres: puede inhibir también translocación en sistemas modelo. Cuatro: inhibe la formación del enlace peptídico en sistemas modelo. Cinco: no interacciona con polisomas y sólo bloquea la translocación cuando se une al ribosoma antes de formar polisomas.

la formación del enlace peptídico. Por este motivo podemos incluir también la kirromicina entre los inhibidores de la formación del enlace peptídico, si bien el antibiótico no ejerce una acción directa sobre el centro peptidil transferasa.

Abundan las toxinas conocidas de naturaleza proteica (alfa sarcina, mitogillina, restrictocina, enomicina y PAP) o glicoproteica (abrina, ricina) que bloquean el ciclo de elongación de la cadena peptídica selectivamente en sistemas eucarióticos por inactivar catalíticamente la subunidad mayor del ribosoma. En el caso de alfa sarcina, mitogillina y restrictocina, sabemos que esta inactivación de la subunidad 60S por las toxinas se debe al hecho de cortar enzimáticamente 320 nucleótidos del extremo terminal 3' del ARN de



28S de la subunidad mayor del ribosoma. Estas toxinas de naturaleza proteica son muy activas en sistemas acelulares, pero no en células intactas; no les es fácil atravesar la barrera celular de la permeabilidad.

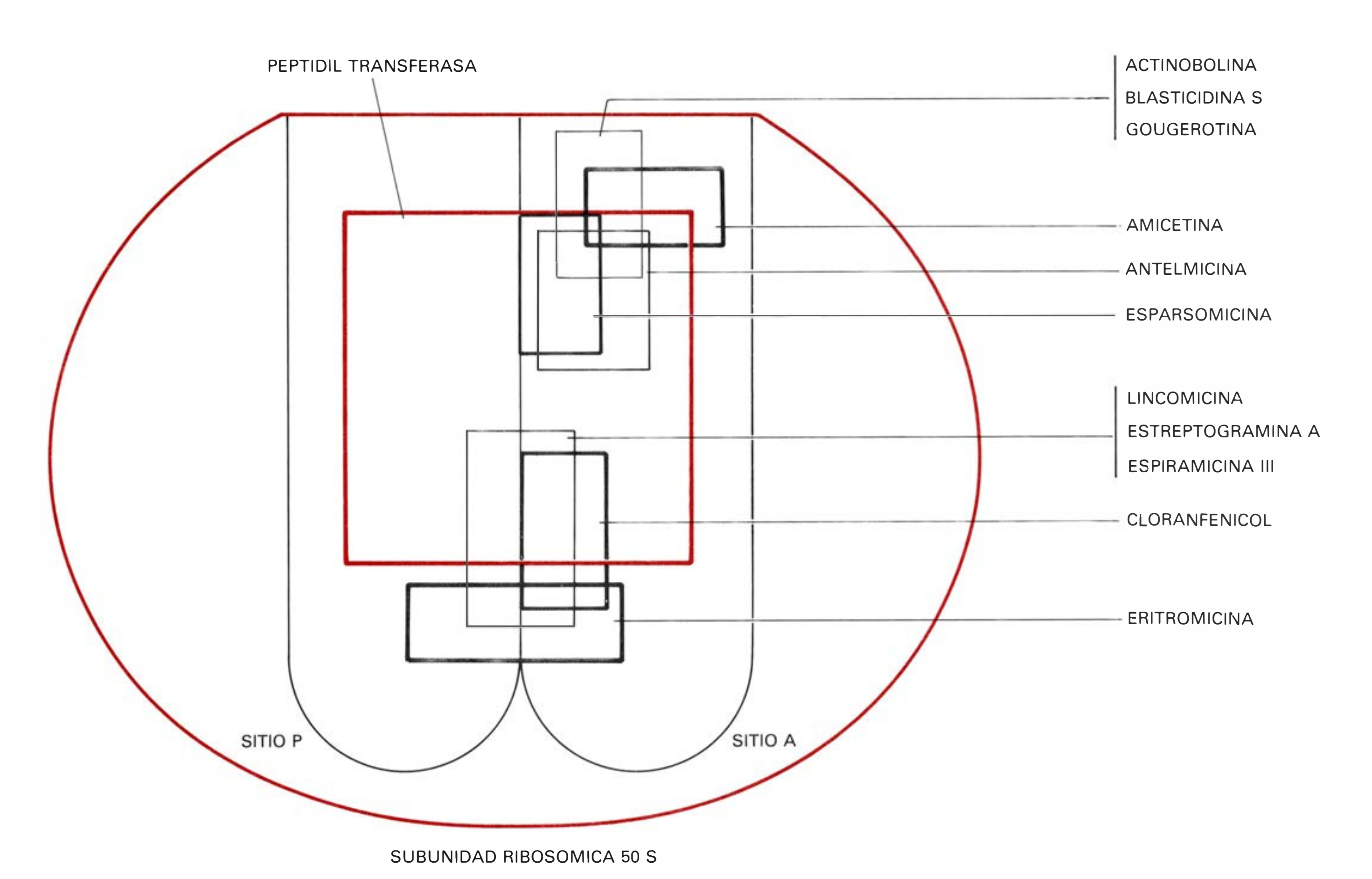
Las toxinas de naturaleza glicoproteica (ricina y abrina) están compuestas de dos cadenas glicoproteicas: la cadena *B* facilita la entrada de la cadena *A*, que es la que actúa enzimáticamente en la subunidad 60S del ribosoma; por este motivo ricina y abrina se manifiestan muy activas en células intactas, a pesar de su elevado peso molecular (65.000). Los ribosomas tratados con estas toxinas de naturaleza proteica o glicoproteica resultan inactivados en su interacción con el complejo FE-1-GTP; ellas bloquean la fijación enzimática de aminoacil-ARNt. Y los ribosomas en cuestión resultan inactivados en la interacción del complejo FE-2-GTP, lo que explica que las toxinas puedan bloquear también la translocación. Merece la pena señalarse una reciente observación: las toxinas de naturaleza proteica (alfa sarcina, mitogillina, restrictocina), aunque entran difícilmente en las células intactas, penetran, y son por tanto activas, en células infectadas con picornavirus.

Todos los compuestos que causan errores en la lectura del ARNm actúan a nivel de la subunidad ribosómica menor. En este amplio grupo de compuestos se incluyen los antibióticos aminoglicosídicos, que participan de los siguientes rasgos: presencia de estreptamina o desoxiestreptamina en su estructura, naturaleza catiónica, amplio espectro de actividad antibacteriana (puesto que muchos de ellos son activos en bacterias gram positivas, gram negativas y ácido-alcohol resistentes), diversos errores en la lectura de los distintos ARNm (debido a la incorporación de aminoácidos en algunas posiciones que no corresponden a las características codificadoras de los tripletes nucleotídicos pertinentes) y un efecto bactericida, que no tiene fácil explicación, pues la mayoría de los otros agentes antibacterianos que inhiben biosíntesis de proteínas son bacteriostáticos. Debido a su efecto inductor de errores de lectura, algunos auxotrofos sensibles a antibióticos aminoglicosídicos llegan a desarrollarse en concentraciones subletales de los mismos en ausencia de algunos aminoácidos esenciales. Este fenómeno, característico de tales antibióticos, recibe el nombre de reparación o supresión fenotípica, por alterarse el fenotipo.

De acuerdo con el azúcar que poseen podemos distinguir, dentro del grupo de los antibióticos aminoglicosídicos que causan errores de lectura, los com-

TERMINACION
AUG
UAA
(f_2)
FE1. GDP + Pi
Met-AA_1-AA_2-...-AA_{n-2}-AA_{n-1}-AA_n
P
A
ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDICOS QUE CONTIENEN DEOSXIESTREPTAMINA
ABRINA
RICINA
PAP
ALFA SARCINA
CHARTREUSINA
GRUPO DE LA HARRINGTONINA
GRUPO DE LA TETRACICLINA
ACIDO FUSIDICO ●●
(d_1)
RF
GTP
GDP + Pi
(g_1)
INHIBIDORES DEL PASO (d)
AUG
Met
AA_1
P
A
UAA
RF
Met-AA_1-AA_2-...-AA_{n-2}-AA_{n-1}-AA_n
P
A
RF
(g_2)
INHIBIDORES DE LA FORMACION DEL ENLACE PEPTIDICO (PASO (e))
(A201A)
ACTINOBOLINA
AMICETINA
ANISOMICINA
ANTELMICINA
BLASTICIDINA S
BRUCEANTINA ●
GOUGEROTINA
GRUPO DE LA HARRINGTONINA ●
(HOLACANTONA)
GRUPO DE LA LICORINA
GRUPO DE LA NARCICLASINA
PUROMICINA
ESPARSOMICINA
ACIDO TENUAZONICO
GRUPO DE LA TRICODERMINA
GRUPO DE LA VERRUCARINA A ●
(e_1)
AUG
UAA
P
A
Met-AA_1-AA_2-...-AA_{n-1}-AA_n
(h)
INHIBIDORES DE LA FUNCION DE FE2 Y GTP
AUG
UAA
60 S
40 S
ARN tn

PROCESO DE LA TRADUCCION en células eucarióticas: sitio de acción de los inhibidores. Un punto: no interacciona con polisomas pero se une a la subunidad ribosómica 60S libre y bloquea los primeros ciclos de formación del enlace peptídico. Dos: es un inhibidor de la fijación del aminoacil-ARNt en células intactas o en sistemas integrados en los que la elongación tiene lugar en presencia de FE1 y FE2. Los inhibidores en paréntesis se estudian sólo en sistemas acelulares de levadura.



ESQUEMA GENERAL del centro peptidil transferasa en ribosomas procarióticos y sitio de acción de los antibióticos inhibidores. Se muestran los inhibidores que actúan en los sitios aceptor o donador del centro peptidil transferasa, así como la eritromicina, que no bloquea formación del enlace peptídico.

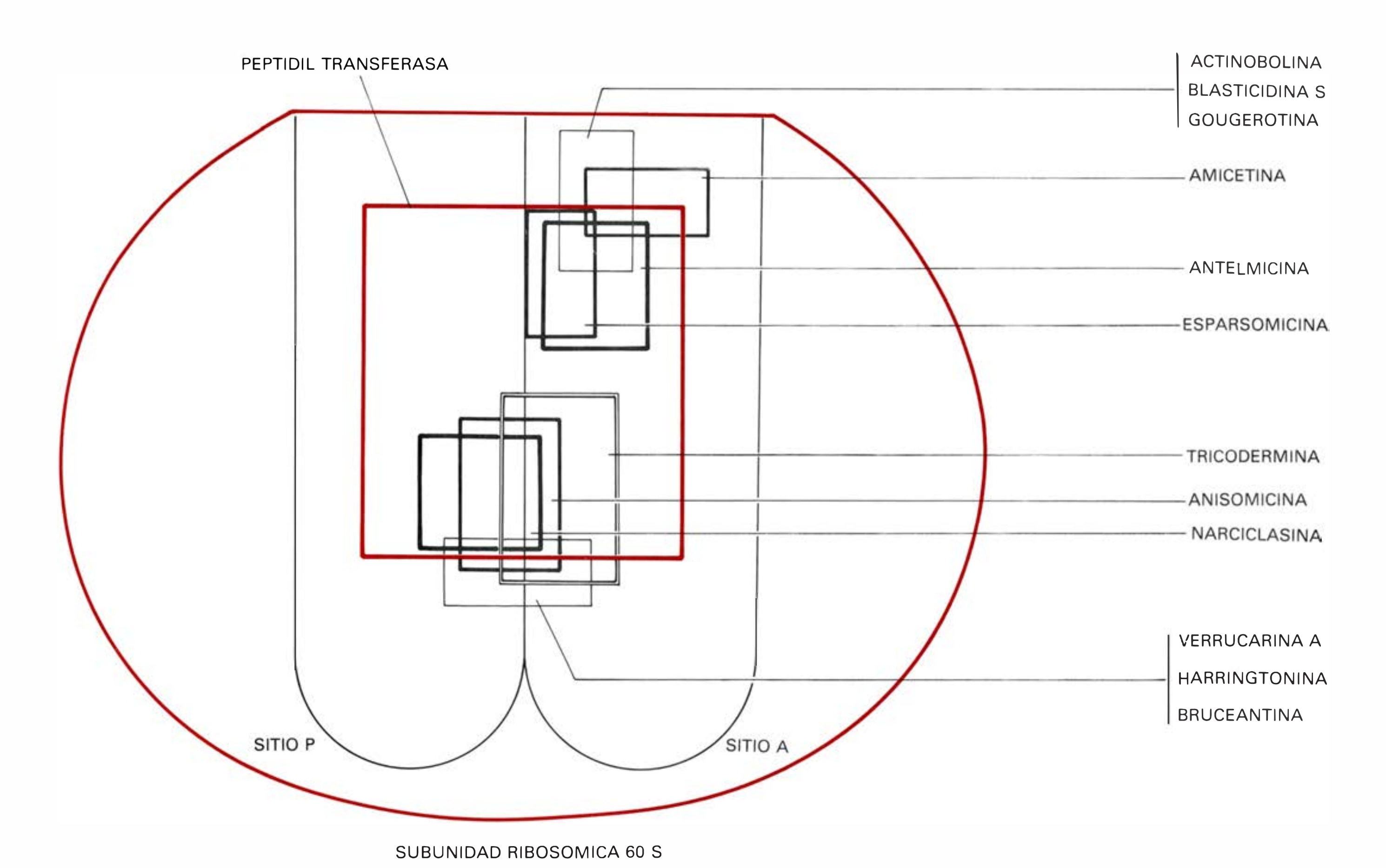
puestos que contienen estreptamina (estreptomicina, dihidroestreptomicina, hibrimicina A_1, hibrimicina A_2, hibrimicina A_3), epistreptamina (hibrimicina B_1, hibrimicina B_2, hibrimicina B_3) y desoxiestreptomina o un derivado de la misma (neamina, neomicina *B*, neomicina *C*, kanamicina *A*, kanamicina *B*, kanamicina *C*, tobramicina, gentamicina *A*, gentamicina C_{1a}, sisomicina, gentamicina C_1, gentamicina C_2, paromomicina *I*, paromomicina *II*, ribostamicina, butirosina *A*, butirosina *B*, higromicina *B*, lividomicina *A*, lividomicina *B* y amikacina).

Algunos de estos antibióticos contienen desoxiparomamina o paromamina (*D*-glucosamina unida a 2-desoxiestreptamina) (como son lividomicina *B*, paromomicinas, gentamicina *A* y kanamicina *C*) o hiosamina *B* (N-metil-2-desoxiestreptamina) (como es la higromicina *B*). Difieren de otros antibióticos que causan errores de lectura en ser activos no solamente en bacterias, sino también en células eucarióticas. El interés de este efecto en células eucarióticas, poco frecuente, por otro lado, radica en que sus ribosomas son mucho más resistentes que los de bacterias a los diversos agentes y condiciones que determinan la inducción de errores de lectura.

Todos los antibióticos aminoglicosídicos anteriormente citados que se han ensayado en sistemas acelulares inhiben la síntesis de polipéptidos dirigida por ácidos ribonucleicos mensajeros sintéticos o naturales y dan lugar a inducción de errores de lectura. A pesar de ello, estos antibióticos no tienen todos el mismo sitio de interacción en el ribosoma. Se ha llegado a proponer que la estreptomicina tiene un solo sitio de acción en el ribosoma, en tanto que se conceden muchos para otros antibióticos aminoglicosídicos. Ello explicaría la dificultad de obtener mutantes resistentes a los antibióticos aminoglicosídicos (excepto la estreptomicina) en los que se hayan modificado las proteínas alteradas. Además, en los pocos casos en que se ha conseguido, la proteína alterada no era la misma que en el caso de la resistencia a la estreptomicina.

Efectivamente, la resistencia ribosómica a la estreptomicina se debe siempre a una mutación de la proteína *S*12 de la subunidad menor del ribosoma, mientras que hay dos sitios distintos e implicados en la resistencia a la neamina; de los cuales, uno no está localizado y el otro se halla motivado por una alteración de la proteína *S*17 de la subunidad ribosómica 30S. Por otra parte, la proteína *L*6 de la subunidad ribosómica 50S está alterada en un mutante bacteriano resistente a las gentamicinas. Esto que podría parecer sorprendente no lo es, puesto que la mayoría de los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina o sus derivados no afectan sólo al reconocimiento del aminoacil-ARNt (paso *d*), sino también a la translocación (paso *f*), en el ciclo de elongación.

Esta inhibición de translocación por los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina parece estar relacionada, al menos parcialmente, con su interacción con la subunidad ribosómica mayor, tanto en sistemas bacterianos como en células eucarióticas. El efecto inhibidor de translocación se patentiza sobre todo en el caso de la higromicina *B*, las neomicinas y la paromomicina. Estudios de fijación con antibióticos marcados sugieren también que hay diferencias importantes entre el sitio de acción de las estreptomicinas en el ribosoma y los de otros antibióticos aminoglicosídicos. Así, la fijación de dihidroestreptomicina al ribosoma se inhibe en presencia de estreptomicina y se estimula por neomicina, paromomicina y lividomicina, pero no la inmutan las kanamicinas, butirosinas y gentamicinas. La fijación de paromomicina al ribosoma es estimula-



ESQUEMA GENERAL del centro peptidil transferasa en ribosomas eucarióticos y sitio de acción de los antibióticos inhibidores. Se muestran los principales antibióticos y alcaloides que actúan en los sitios aceptor o donador del centro peptidil transferasa. (Véase la ilustración de la página precedente.)

da por la estreptomicina y la dihidroestreptomicina, inhibida por las neomicinas, lividomicinas y butirosinas y no es afectada por la kanamicina.

El centro peptidiltransferasa de la subunidad mayor del ribosoma, que cataliza la formación del enlace peptídico (paso *e*) es similar, en muchos aspectos, en ribosomas bacterianos y de células eucarióticas, pero difiere en otros. De un modo muy general, podremos clasificar, pues, los inhibidores de la formación del enlace peptídico de acuerdo con su sitio de acción: los que bloquean a nivel del sitio donador y los que bloquean a nivel del sitio aceptor. Mientras que ninguno de los antibióticos que actúan en el sitio donador del centro peptidil transferasa de los ribosomas bacterianos es activo en los ribosomas eucarióticos y viceversa, casi todos los inhibidores de formación de enlace peptídico que actúan en el sitio aceptor son comunes a ribosomas de bacterias y de células eucarióticas. Estos hechos sugieren, con toda claridad, que existen unas marcadas diferencias estructurales en el sitio donador del centro peptidil transferasa de ribosomas procarióticos y eucarióticos, que determinan las diferencias de selectividad de los inhibidores. Por contra, parece haber una gran similitud estructural en el sitio aceptor de dicho centro activo, que se refleja en que casi todos los antibióticos que actúan ahí inhiben la formación del enlace peptídico en todo tipo de ribosomas.

La puromicina es el inhibidor de la formación del enlace peptídico de uso más universal y mejor conocido. Este antibiótico actúa como un análogo del terminal 3' de los aminoacil-ARNt (aminoacil-adenosina) en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa, en la subunidad ribosómica mayor de todo tipo de ribosomas tanto procarióticos como eucarióticos.

Por ello, el uso de la puromicina proporciona un método simplificado para el estudio de la formación del enlace peptídico en una reacción en la que el grupo -NH_2 de la puromicina se une al -COOH del aminoácido terminal del peptidil unido al ARNt en el sitio donador del centro peptidil transferasa ("reacción de la puromicina"). Este aminoácido será el último incorporado al peptidil-ARNt en una cadena peptídica en crecimiento; podrá ser, concretamente, la metionina si los sustratos donadores son f-Met-$ARNt_F$ o Met-$ARNt_F$, los iniciadores en sistemas procarióticos y eucarióticos respectivamente. El producto de la reacción (f-Met- o Met- o peptidil-puromicina) no puede tomar parte en el paso siguiente de la síntesis de proteínas. Esta reacción de formación de enlace peptídico, en la que la puromicina actúa de sustrato aceptor, puede desarrollarse con sustratos simplificados que interaccionen con el sitio donador, verbigracia, f-Met- o Ac-Fen- o Ac-Leu-oligonucleótidos, e incluso f-Met- o Ac-Fen- o Ac-Leu-adenosina ("reacción del fragmento"). De los estudios referentes a la estructura de la puromicina y su actividad se desprende lo siguiente: la puromicina revertida es inactiva; para su actividad se requieren el aminoácido y el diaminonucleósido de la puromicina; el grupo –NH– extra de la parte nucleosídica del antibiótico debe ocupar la posición 3' y, por último, se obtienen actividades más altas siempre con aminoácidos de configuración *L* que con aminoácidos de configuración *D* En la mayoría de los casos, se requiere, además, que el aminoácido sea de carácter hidrofóbico, pero se han sintetizado también algunos análogos de la puromicina activos y portadores de aminoácidos hidrofílicos.

Los grupos dimetilo, el grupo metoxilo, el oxígeno furanosílico y el grupo hidroxílico 5' de la puromicina no son necesarios para la actividad biológica

del antibiótico, y se ha demostrado que diversos análogos del terminal 3' de aminoacil-ARNt, como L-Fen-, L-Tir- y L-Leu-adenosina, poseen una actividad similar a la puromicina, como sustratos aceptores, en la reacción de la formación del enlace peptídico. De acuerdo con estos resultados, ha quedado probado que la Fen-adenosina inhibe la interacción de (^{3}H) puromicina con el sitio aceptor del centro peptidil transferasa.

Al igual que la puromicina, todos los demás inhibidores de la formación del enlace peptídico actúan en la subunidad ribosómica mayor (50S o 60S). El amplio grupo de los antibióticos 4-aminohexosil citosínicos (amicetina, gougerotina, blasticidina S y antelmicina), así como la esparsomicina y la actinobolina, bloquean también la formación del enlace peptídico, por actuar en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa en un lugar superpuesto con el de la puromicina. Todos estos antibióticos se excluyen mutuamente en su sitio de unión con el ribosoma e impiden la interacción de la puromicina.

Al igual que la puromicina, esos antibióticos ofrecen un amplio espectro inhibidor; actúan en ribosomas de bacterias, mitocondrias, cloroplastos y células superiores. Pero no lo hacen como sustratos aceptores en la reacción de formación del enlace peptídico, como ocurre en el caso de la puromicina, sino que simplemente bloquean la interacción del terminal 3' del aminoacil-ARNt (aminoacil-adenosina) en el sitio aceptor del centro peptidil transferasa. Del cloranfenicol podemos decir que tiene un modo de acción similar, si bien opera selectivamente en ribosomas de tipo procariótico. Por otra parte, el sitio de interacción del cloranfenicol en el ribosoma no está superpuesto con el de los otros antibióticos citados que actúan en el sitio aceptor, excepto la puromicina, cuya unión al ribosoma se ve obstruida también por el cloranfenicol.

Entre los antibióticos que inhiben el paso *e* (que, recordamos, consiste en la formación del enlace peptídico catalizada por el centro peptidil transferasa) de un modo selectivo en ribosomas procarióticos por actuar en el sitio donador del centro peptidil transferasa, los más conocidos son la lincomicina, la griseoviridina, los antibióticos del grupo de la estreptogramina *A* y los macrolidos de los grupos de la espiramicina y de la carbomicina. Todos estos antibióticos se excluyen mutuamente en su sitio de acción con el ribosoma y operan de una manera similar por bloquear la interacción del terminal 3' del peptidil-ARNt con el sitio donador del centro peptidil transferasa. Sin embargo, su lugar de interacción parece ser más amplio o causar una distorsión, en la estructura del ribosoma, mayor que en el caso de los inhibidores que actúan en el sitio aceptor. Así ocurre que lincomicina, griseoviridina, estreptogramina *A*, espiramicina y carbomicina no sólo bloquean la fijación del terminal 3' del sustrato donador, sino que, en menor escala, inhiben también la fijación del sustrato aceptor; asimismo, bloquean la interacción del cloranfenicol con el sitio aceptor. Estos antibióticos que actúan en el sitio donador no pueden interaccionar con ribosomas que tienen unido peptidil-ARNt al sitio donador o al sitio aceptor. Como consecuencia de ello, sólo pueden inhibir la elongación de la cadena peptídica cuando se han unido a los ribosomas libres antes de comenzar la traducción, pues una vez iniciada la misma, no pueden actuar en los polisomas ya formados.

La bruceantina y los compuestos de los grupos de la verrucarina A y de la harringtonina actúan selectivamente en ribosomas de células eucarióticas bloqueando la interacción del terminal 3' con el sitio donador del centro peptidil-transferasa; en este sistema, equivalen,

TERMINAL 3' DE AMINOCIL-ARNt | PUROMICINA | "PUROMICINA REVERTIDA"

ESTRUCTURAS QUIMICAS del terminal 3' de aminoacil-ARNt, puromicina y "puromicina revertida". Puede observarse la semejanza estructural del aminoacil-ARNt y la puromicina, con actividad aceptora en la formación del enlace peptídico, y su diferencia con la puromicina revertida, es inactiva.

en su modo de acción, a los antibióticos anteriormente citados que actuaban en dicho sitio en ribosomas procarióticos. Sin embargo, la anisomicina, la tricodermina y la narciclasina, que tienen un sitio de acción similar y se excluyen mutuamente con aquéllos en su interacción con el ribosoma, difieren de ellos por razón de su capacidad de unirse a ribosomas que poseen sustratos unidos al sitio donador o aceptor. Lo que explica que anisomicina, tricodermina y narcilasina lleguen a unirse a los ribosomas de los polisomas ya formados y bloqueen la elongación dela cadena peptídica siempre en ribosomas eucarióticos. El ácido tenuazónico, que actúa de un modo similar a la anisomicina, se distingue por su selectividad de acción no observada en los otros inhibidores: es activo en los ribosomas de células de mamíferos, pero no en ribosomas de levadura.

Hay dos características importantes concernientes a los inhibidores de la translocación (paso *f*). Una de ellas es que se conocen muy pocos inhibidores de este paso que actúen en sistemas modelo de ribosomas procarióticos, mientras que existe una abundante representación de los inhibidores que intervienen en las distintas reacciones del complejo paso de la translocación en ribosomas eucarióticos. La otra característica de la translocación que merece una mención especial es que sólo los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina, o un aminoazúcar derivado de éste, son inhibidores comunes de dicho paso en ambos tipos de ribosomas: procarióticos y eucarióticos.

Como ya hemos indicado antes, los antibióticos aminoglicosídicos que portan el aminoazúcar desoxiestreptamina o sus derivados y muy principalmente higromicina *B*, neomicina y paromomicina, además de inducir errores de lectura en ribosomas bacterianos y eucarióticos, inhiben la translocación en ambos tipos de sistemas; esta acción de los antibióticos se halla relacionada, parcialmente al menos, con su efecto estabilizador del peptidil-ARNt en el sitio *A* del ribosoma. Por disponer estos antibióticos de muchos sitios de interacción con el ribosoma, no está bien definido cuáles de entre ellos sean los más relevantes para esta acción inhibidora. A pesar de lo cual, ciertas interacciones con ambas subunidades, mayor y menor, del ribosoma parecen tener importancia en sus efectos estabilizantes del peptidil-ARNt en el sitio *A* y con su efecto inhibidor de la translocación.

Los antibióticos macrolidos de los grupos de la eritromicina, la metimicina y la lancamicina, así como la espectinomicina y los antibióticos del grupo de la estreptogramina *B*, actúan selectivamente en células procarióticas; en bacterias intactas se comportan como inhibidores de la translocación, ya que por mor de su efecto inhibidor el peptidil-ARNt queda bloqueado en el sitio *A*. Pero todos esos antibióticos son muy pobres inhibidores de la mayoría de los sistemas modelo de translocación en sistemas acelulares; su efecto se manifiesta exclusivamente cuando se usa peptidil-ARNt con un polipéptido mayor que cierta longitud. Estas características y el hecho de que tales antibióticos no actúen en polisomas, porque no interaccionan con ribosomas que tengan peptidil-ARNt unido al sitio *P* o al sitio *A*, hace suponer que su acción inhibidora se manifiesta porque, cuando el residuo peptídico del peptidil-ARNt alcanza cierta longitud y el antibiótico está unido previamente al ribosoma, hay un impedimento estérico que no permite el movimiento de dicho peptidil-ARNt fuera del sitio *A*.

Mas no todos esos antibióticos poseen el mismo sitio de interacción. Espectinomicina se une a la subunidad ribosómica 30S y las mutaciones que dan lugar a una resistencia al antibiótico se manifiestan por una alteración en la proteína *S*5 de dicha subunidad. Por el contrario, los antibióticos del grupo de la estreptogramina *B* y los macrolidos se unen a la subunidad ribosómica 50S, requiriéndose para dicha interacción la proteína *L*16 de esta subunidad. Se han descrito, no obstante, tres tipos de mutaciones que determinan resistencia a la eritromicina y, en ninguno de estos casos, está afectada la proteína *L*16; así, alteraciones en la proteína *L*4 o en el ARN 23S de la subunidad 50S causan una menor afinidad del antibiótico por dicha subunidad, mientras que mutantes en la proteína *L*22 inducen resistencia al antibiótico, sin afectar su afinidad por el ribosoma.

Interesa destacar la existencia de dos grupos de antibióticos macrolidos (espiramicina y carbomicina) que inhiben la formación del enlace peptídico, y de otros tres (eritromicina, metimicina y lancamicina) que no afectan a dicho paso, a pesar de que toda la prueba experimental muestra que el sitio de acción de las agliconas de estos macrolidos en el ribosoma se halla superpuesto. Parece ser que los disacáridos unidos a las agliconas de los antibióticos de los grupos de la espiramicina y la carbomicina constituyen los determinantes de su acción inhibidora en la formación del enlace peptídico; en efecto, al perder dicho disacárido, los antibióticos resultantes se comportan como la eritromicina.

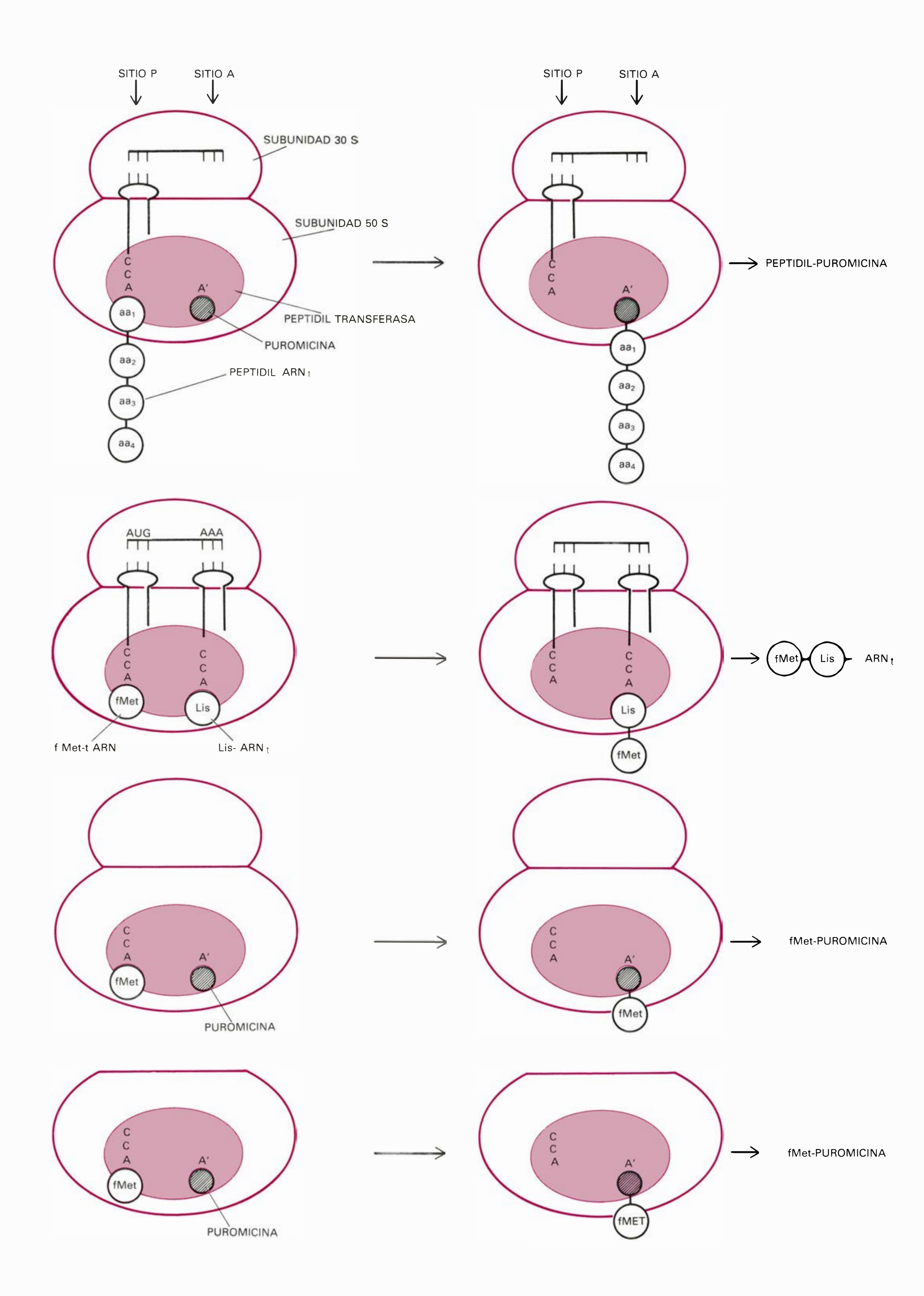
Además de los antibióticos aminoglicosídicos que contienen desoxiestreptamina, se conocen tres tipos de inhibidores que bloquean la translocación en células eucarióticas; unos actúan a nivel del factor de elongación FE-2, modificándolo; otros interaccionan con la subunidad ribosómica 40S y, finalmente, hay un tercer grupo de inhibidores que operan en la subunidad 60S. La toxina diftérica y la toxina *PA*, producidas por *Corynebacterium diphtheriae* $(\beta)^{tox+}$ y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, inactivan enzimáticamente, y de una manera selectiva, el factor de elongación eFE-2 de células eucarióticas de acuerdo con la reacción:

$$\text{eFE2} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{ADF-ribosil-EF-2} + \text{nicotinamida} + \text{H}^+$$

en presencia de toxina diférica o toxina PA.

La reacción está muy desplazada hacia la derecha. El ADP-ribosil-eFE-2 forma un complejo con el GTP que interacciona con el ribosoma de un modo similar a como lo hace el factor eFE-2. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis del GTP es muy pequeña; por cuya razón el complejo ADP-ribosil-eFE-2-GTP-ribosoma es muy estable y, mínima, la eficacia del ADP-ribosil-eFE-2 como catalizador de la translocación. La toxina diftérica (con un peso molecular, PM, 60.000) se muestra activa en numerosas células eucarióticas intactas, puesto que una parte de su molécula denominada fragmento *B* (PM 39.000) es responsable de la interacción con la membrana y entrada posterior en la célula del fragmento *A* (PM 22.000), necesario en forma libre para catalizar la ADP-ribosilación del factor FE-2 en un aminoácido básico denominado diftamina. La toxina *PA* (PM 60.000) parece tener un modo de acción similar; su fragmento *A* tiene un peso molecular de 36.000.

Hay múltiples pruebas genéticas y bioquímicas que demuestran la actividad de los alcaloides criptopleurina, tiloforina, tilocrebrina, emetina y tubulosina a nivel de la subunidad ribosómica 40S en sitios idénticos o superpuestos. Todos estos compuestos inhiben la translocación enzimática como consecuencia de dicha interacción. Por otra parte, la pederina y los antibióticos del grupo de la cicloheximida interaccionan con la subunidad ribosómica


SITIO P
SITIO A
SUBUNIDAD 30 S
SUBUNIDAD 50 S
C C A
A′
aa1
aa2
aa3
aa4
PEPTIDIL TRANSFERASA
PUROMICINA
PEPTIDIL ARNt
SITIO P
SITIO A
PEPTIDIL-PUROMICINA
AUG
AAA
fMet
Lis
f Met-t ARN
Lis- ARNt
fMet
Lis
ARNt
PUROMICINA
fMet-PUROMICINA
PUROMICINA
fMET
fMet-PUROMICINA

60S; estos compuestos bloquean el proceso fisiológico de la translocación enzimática que requiere eFE-2 e inhiben la translocación no enzimática que tiene lugar en sistemas acelulares en ausencia de eFE-2, al elevar la concentración de K^+ o de NH_4^+. La pederina, sin embargo, es igualmente activa como inhibidor en ribosomas resistentes a la cicloheximida; ello sugiere que ambos compuestos actúan en distinto sitio de la subunidad 60S.

Las bacteriocinas colicina *E*3 y cloacina *DF*13 merecen una mención especial dentro de los inhibidores de biosíntesis de proteínas. Su espectro inhibidor es muy selectivo, según hallamos en muchas bacteriocinas, y se concreta a los géneros más próximos al de las bacterias productoras. Por ello, los espectros inhibidores de la colicina *E*3 (producida por algunas cepas colicinogéticas de *Escherichia coli*) y de la cloacina *DF*13 (producida por algunas cepas cloacinogéticas de *Enterobacter cloacae*) se distinguen en razón de la permeabilidad, aunque su modo de acción en sistemas acelulares viene a coincidir prácticamente. Así, se ha desvelado que tanto la colicina *E*3 como la cloacina *DF*13 son proteínas con una actividad ribonucleasa muy específica, la de inactivar catalíticamente el ARN 16S de la subunidad ribosómica 30S cuando está integrado en dicha estructura, por romper los 49 nucleótidos finales del terminal 3' de dicho ARN 16S. En virtud de esa lesión estructural, los ribosomas afectados no resultan bloqueados específicamente en su función en un paso concreto de la traducción. Sin embargo, estos ribosomas rinden mucho menos que los normales en diversas reacciones de las fases de iniciación y de la elongación. Sumados estos efectos parciales, resulta prácticamente una inactivación de los ribosomas dañados.

La fase de terminación en el proceso de la traducción comienza cuando se reconoce un triplete terminador del ácido ribonucleico mensajero (código sin sentido que puede ser alguno de los tripletes de bases UAA o UAG o UGA), determinando así la interacción de los factores de terminación con el ribosoma. Se ha aislado un solo factor de terminación (factor FR) de sistemas eucarióticos, que se requiere en el paso g_1 junto con una molécula de GTP, que debe hidrolizarse. Se conocen tres factores de terminación (FR-1, FR-2 y FR-3) que pueden intervenir en el paso equivalente en sistemas bacterianos. La eficacia del factor FR-2 se potencia en presencia del factor FR-3; el factor FR-1 no requiere el concurso de los otros factores. De modo parecido a lo que ocurre en sistemas eucarióticos, es muy probable que también se requiera GTP en el paso g_1 en bacterias, aunque aún no ha podido demostrarse concluyentemente. Después del reconocimiento de los factores de terminación, el centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor ejerce su actividad peptidil hidrolasa rompiendo el enlace entre el peptidilo y el ARNt del peptidil-ARNt, de suerte que se libera la cadena peptídica (paso g_2). Para completar la terminación, se requiere todavía una reacción posterior (paso *h*), a lo largo de cuya fase se libera el ARNt descargado. Este paso espera una mayor clarificación en sistemas eucarióticos, pero los estudios en sistemas de bacterias han mostrado que se requiere otro nuevo factor (factor RR) y el factor de elongación FE-G, que intervienen en este paso *h* final, donde debe haber, además, la hidrólisis de una nueva molécula de GTP.

Aunque se han estudiado diversos compuestos que inhiben los pasos g_1, g_2 y *h* no se conocen inhibidores específicos de la terminación. Ocurre, sin embargo, que hay diversos inhibidores del ciclo de elongación que lo son también de la terminación; los sitios ribosómicos implicados en los pasos g_1, g_2 y *h* parecen hallarse en estrecha relación, sino superpuestos, con los responsables de los pasos *d*, *e* y *f*, respectivamente. Así, estreptomicina, tetraciclina y tiostrepton se han descrito como inhibidores del paso g_1, y es muy probable que otros inhibidores del paso *d* bloqueen, además, la terminación de un modo selectivo. Por otra parte, el centro peptidil transferasa de la subunidad ribosómica mayor está implicado en la formación del enlace peptídico (paso *e*) y en la actividad peptidil hidrolasa (paso g_2). Por ello, el paso g_2 de terminación es bloqueado por todos los inhibidores del paso *e* ensayados en sistemas bacterianos y de células superiores, con la misma selectividad que muestran en su función inhibidora de la formación del enlace peptídico.

Indicamos antes que se necesitaba la presencia del factor FE-G y de GTP en el paso *h* en sistemas bacterianos. De ahí que lo más probable quizá sea que inhibidores que interfieren con la actividad del factor FE-G impidan, a su vez, el paso *h* en bacterias. Además, si este paso se registra en eucariotas por un mecanismo similar en la terminación de la cadena peptídica, debería esperarse que, no sólo el ácido fusídico, sino también muchos otros compuestos que interfieren con las funciones del FE-2 e hidrólisis del GTP (tales como abrina, ricina, alfa sarcina, toxina diftérica y cicloheximida) bloquearán el paso *h* en sistemas eucarióticos.

Los análogos del GTP merecen capítulo aparte como inhibidores de biosíntesis de proteínas. De ellos, el mejor conocido es el guanilil-metilendifosfonato (GMP-PCP o GDPCP o GMP-P-CH_2-P), portador de un grupo $-CH_2-$ en sustitución del oxígeno entre los átomos de fósforo β y γ, bloqueando la rotura enzimática en esta posición. Se diseñó la estructura de este análogo con la precisa intención de estudiar la naturaleza de las reacciones que implican la hidrólisis del GTP en la síntesis de proteínas. Desde que se mostró el efecto inhibidor de este análogo del GTP en la biosíntesis proteica, se ha venido usando con asiduidad en varias reacciones modelo de los pasos de la iniciación, elongación y terminación que implican la hidrólisis del GTP. Se ha sintetizado otro análogo del GTP, el guanilil-imido-difosfato (GMP-PNP o GDPNP o GMP-P-NH-P), a fin de investigar el papel del GTP en la translocación.

Los estudios con dichos análogos del GTP han permitido deducir la existencia de un sitio ribosómico superpuesto e implicado en la interacción de los distintos factores proteicos que exige la hidrólisis del GTP en la traducción. Guaninil-metilen-difosfonato y guanilil-imido-difosfato pueden reemplazar al GTP en la interacción con los diferentes factores proteicos y en la interacción de los complejos correspondientes con el ribosoma.

Sin embargo, en todos los casos en los que se han llevado a cabo estudios detallados (sobre todo de elongación) se ha podido mostrar que los análogos del GTP bloquean o disminuyen considerablemente las reacciones que siguen, sin solución de continuidad, los pasos donde ocurre la hidrólisis del GTP. Se dispone de abundantes pruebas experimentales que sugieren que, durante la elongación de la cadena pep-

SISTEMAS MODELO para el estudio de la formación del enlace peptídico. En la parte superior se representa esquemáticamente la reacción de la puromicina, en la que el sustrato donador es peptidil-ARNt (o f-Met-ARNt) y el sustrato aceptor puromicina. En el esquema de la segunda fila el sustrato donador es el f-Met-ARNt y el sustrato aceptor lisil-ARNt. En el esquema de la tercera fila el sustrato donador unido a los ribosomas es el CCA-Metf y el aceptor, la puromicina. El esquema de la cuarta fila es similar aunque con subunidades 50S.

tídica, se liberan lentamente del ribosoma los análogos del GTP y, por tanto, también los factores FE-Tu, FE-1, FE-G y FE-2, unidos a ellos. Por cuyo motivo, los pasos siguientes a la fijación de aminoacil-ARNt y la translocación (formación del enlace peptídico y fijación de aminoacil-ARNt, respectivamente) se retrasan bastante en presencia de dichos análogos del GTP. Todos los datos experimentales apoyan la suposición de que la hidrólisis del GTP en el ciclo de elongación resulte esencial para la liberación rápida de los factores unidos al ribosoma. Es muy probable que se asista a una situación similar en el bloqueo de la iniciación y de la terminación por los análogos del GTP.

A pesar de la amplia clasificación de los inhibidores de biosíntesis de proteínas de acuerdo con su selectividad, hay casos en que su espectro de acción es mucho más limitado, debido a la barrera impuesta por la permeabilidad celular. Es bien sabido que muchos antibióticos que actúan en ribosomas de tipo 70S se muestran activos en bacterias gram positivas, pero no en bacterias gram negativas ni ácido alcohol resistentes; como también pertenece al dominio público que numerosos antibióticos que actúan en ribosomas 80S no son activos en levaduras. Siguiendo en esta línea, varios antibióticos, que actúan en ribosomas de tipo 80S, no operan en cultivos celulares (gougerotina, edeína A_1, antelmicina, blasticidina S, higromicina B); y es justo poner de relieve que la barrera de la permeabilidad se altera en dichos cultivos infectados con picornavirus, resultando así un efecto inhibidor de los citados antibióticos en las células infectadas. Hay otros casos, sin embargo, en que un espectro inhibidor más limitado obedece a diferencias estructurales dentro de los ribosomas que adscribimos al tipo procariótico o eucariótico. Así, por ejemplo, ocurre que el ácido tenuazónico actúa en ribosomas de mamíferos, pero no en ribosomas de levadura; la cicloheximida, que en general es activa en todo tipo de ribosomas 80S, no interviene en ribosomas de ciertas cepas silvestres de *Saccharomyces fragilis* y *Saccharomyces lactis*; el ácido fusídico no actúa en los sistemas de traducción de las mitocondrias de *Neurospora crassa* y de *Bacillus subtilis* en su fase de formación del septum.

Los ribosomas de mitocondrias de cerebro parecen sensibles a la emetina, considerada normalmente un inhibidor selectivo de ribosomas eucarióticos. Y recordemos el caso de las archibacterias (bacterias metanogénicas, halófilas extremas y las termófilas de los géneros *Sulfolobus* y *Thermoplasma*; [véase: "Archibacterias", por Carl R. Woese, INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, agosto de 1981] que, al contrario de todas las demás bacterias, tienen un factor de elongación más próximo al FE-2 de los eucariotas que al FE-G de los procariotas al ser sensible a la toxina diftérica, formándose el ADP-ribosil-FE-2, como ocurre en las células superiores. Es asimismo sorprendente que los ribosomas de las archibacterias son sensibles a la anisomicina (un antibiótico que actúa selectivamente en ribosomas eucarióticos) pero también al cloranfenicol (un antibiótico selectivo de ribosomas procarióticos). Por estos motivos y por otras muchas características, no es sorprendente que las archibacterias se consideren ya como microorganismos procarióticos independientemente de todos los demás.

El hecho conocido de que todas las células eucarióticas posean mitocondrias y que, además, vegetales y algas superiores contengan también cloroplastos, con sistemas de proteína de tipo procariótico, determina que los resultados obtenidos cuando se usan los inhibidores de la traducción en células intactas deben interpretarse con sumo cuidado.

Aunque la mayoría de los inhibidores indicados en la ilustración de páginas más atrás actúan bloqueando específicamente síntesis de proteínas, hay varios casos en los que su acción es menos específica. Así, en células intactas la edeína A_1 constituye principalmente un inhibidor de la síntesis del ADN y la cicloheximida puede impedir no sólo la traducción, sino también la síntesis de ADN y de ARN. Otro ejemplo importante lo hallamos en los antibióticos aminoglicosídicos y las tetraciclinas, cuya múltiple interacción puede llegar hasta inhibir otros procesos, amén de la síntesis de proteínas. O citemos el cloranfenicol, considerado desde hace tiempo un inhibidor selectivo de biosíntesis de proteínas en bacterias, que al parecer bloquea también la síntesis de ADN a concentraciones más bien elevadas; este efecto podría ser la razón principal del efecto tóxico irreversible del antibiótico en ciertos casos aislados en su uso médico.

Las consideraciones precedentes deberán ser tenidas en cuenta cuando se emplean los inhibidores de la traducción en células intactas. Evidentemente, los riesgos de interpretaciones erróneas son menores cuando se usan los inhibidores en sistemas acelulares para estudiar reacciones específicas.

Temas metamágicos

Algo tan humano como es el razonamiento por analogía, ¿cómo podría comprenderlo un ordenador?

Douglas R. Hofstadter

Al investigar sobre inteligencia artificial, mis doctorandos Gray Clossman y Marsha Meredith, y yo mismo, hemos estado observando procesos típicos del pensamiento humano, tanto de la vida cotidiana como en dominios más restringidos, y en todas las situaciones observadas nos pareció descubrir que en el seno de las representaciones internas de los conceptos existen subestructuras dotadas de una especie de independencia respecto de las estructuras en que están inmersas y de las que forman parte. Tales subestructuras son modulares, en el sentido de que son exportables desde su contexto nativo a otros contextos. Son estructuras autónomas por derecho propio, y nosotros las hemos llamado "roles". Un "rol" es, por tanto, un "módulo de descripción" natural, que al parecer no encuentra dificultad en mudarse de su primer hogar para alojarse en nuevos lugares, algunos de los cuales podrían, al menos a primera vista, parecer francamente insólitos.

Tenemos un ejemplo en el rol "Primera Dama". La mayoría de los americanos emplean este término con flexibilidad mucho mayor de lo que sospechan. De ser preguntados seguramente responderían que la "primera dama" es la "esposa del presidente", sin dedicarle mayores reflexiones. Empero, si les preguntásemos por la primera dama del Canadá, es casi seguro que se les vendría a la mente el nombre o la imagen de Margaret Trudeau. Puede que rechazasen tal idea después de un instante, pero, desde nuestro enfoque, lo importante es que se les ocurra pensar en ella. Ante todo, esta dama es conocida por ser la *ex*-mujer de Pierre Elliott Trudeau. En segundo lugar, Trudeau no es el presidente de Canadá, sino su primer ministro. ¿En qué sentido podemos entonces decir que la "ex-mujer del primer ministro" es equivalente a la "esposa del presidente"?

Antes de que el lector empiece a replicar: "Bien, es que 'esposa' y 'ex-esposa' contienen nociones muy relacionadas, al igual que están relacionadas las ideas de 'primer ministro' y 'presidente'", fijémonos en quién sería la actual primera dama británica. ¿Qué nombre se le ha ocurrido en primer lugar? ¿Margaret Thatcher? ¿La reina Isabel? No cabe duda de que son mujeres; pero, ¿desempeñan el papel de primeras damas? ¿No se le ha ocurrido que más les corresponde a Denis Thatcher o al Príncipe Felipe? Aunque la idea parezca absurda a primera vista, tiene el suficiente poder sugestivo para ser digna de consideración, sobre todo en el caso de Denis Thatcher; tanto así que hace poco recorté un artículo periodístico donde el señor Thatcher era presentado como "primera dama" de Gran Bretaña.

¿Qué sentido podemos darle a todo esto? ¿Cómo puede decirse que un hombre es "primera dama"? Sucede que el lenguaje es mucho más ambiguo de lo que pudieran hacernos creer las definiciones del diccionario. Su ambigüedad emana de la ambigüedad misma de los conceptos que lo sustentan, particularmente en el caso de ideas tan escurridizas como la de "rol".

Evidentemente, podríamos aducir que el papel de "primera dama" puede transferirse sin dificultad al de "marido de la primera ministra", sencillamente porque el significado de "primera dama" es el de "cónyuge del jefe del estado". Pero tampoco así saldríamos adelante. Hasta hace poco, el título de primera dama pertenecía en Haití a Simone Duvalier, viuda del anterior presidente, François ("Papa Doc") Duvalier, y madre del presidente en ejercicio, Jean-Claude ("Baby Doc") Duvalier. No hace mucho se desarrolló una agria lucha por el poder entre Simone Duvalier y su nuera, Michelle Bennet Duvalier, esposa de "Baby Doc", ambicionando ambas el título de primera dama. Al cabo, parece ser la más joven quien ha logrado imponerse, arrebatando a su suegra el título de "Primera Dama de la República", dejándole, en compensación, el de "Primera Dama de la Revolución" con carácter vitalicio. ¿Desea el lector enmendar su sugerencia y decir "el cónyuge (o ex-conyuge) del actual (o anterior) jefe del estado"? Sabe Vd. tan bien como yo que podremos encontrar nuevas excepciones. Podríamos, por ejemplo, imaginar una asamblea del Círculo de Petapoucos, donde la mujer del Petapouco Mayor fuese introducida como Primera Dama del Club. Desde luego, malamente podremos considerar al Petapouco Mayor como jefe de un estado, por lo cual enmendamos nuevamente nuestra definición, transformándola en "cónyuge (o ex-cónyuge) de la persona principal de cualquier organización de cierta tradición o antigüedad". Pero imaginemos... Creo que será mejor dejar al lector la tarea de hallar nuevas excepciones. Cualquiera que sea la regla que se proponga, es casi seguro que podrá concebirse alguna forma excepcional.

Mucho peor es lo que está sucediendo con la noción que pretendemos definir. Conforme vamos haciéndola más general y flexible, estamos echando a perder su elemento crucial, a saber, que su significado más *natural,* al menos en los Estados Unidos, es el de "esposa del presidente". Si tan sólo se nos diera la definición general, podríamos sacar la impresión de que Paco Picapela, antiguo suegro del gerente accidental del supermercado de la esquina, podría ser tan buen ejemplo de "primera dama" como Nancy Reagan lo es hoy. Cuando tales absurdos suceden, las cosas van mal. La definición no solamente debe ser general, sino incluir también elementos que nos informen del *espíritu* que la motiva.

Los sistemas de proceso de datos pasan las de Caín para enterarse del espíritu de las cosas; les es mucho más fácil tomarlas al pie de la letra. Por este motivo, los humanos tienen que consumir enormes cantidades de tiempo detallándoles prolijamente descripciones de ideas que cualquier infradotado comprendería de un golpe de vista presentándole un ejemplo adecuado. La cuestión es cómo lograr que un ordenador comprenda el significado de "primera dama". Hemos de examinar la noción de "rol" con algún detenimiento.

Para ilustrar cómo podemos dar modelos de la noción de "rol" en dominios más formalizados que el protocolo político, volveré la atención hacia uno de mis dominios favoritos: los números naturales. Presentaré algunos pequeños jeroglíficos en los que Gray, Marsha y yo hemos estado pensando. Ninguno de ellos admite respuesta única, sino, más bien, diversos grados de plausibilidad o defensa. Estamos interesados en diseñar un programa de ordenador capaz de percibir el motivo

que inspira cada posible respuesta, y que sería, entonces, capaz de salirnos con el mismo conjunto de "impresiones" que una persona corriente tendría acerca de qué soluciones son buenas y cuáles, malas.

El dominio de los números naturales pudiera en principio parecer demasiado pequeño, ser un cosmos matemático tan exiguo como preciso y rígido; la verdad es que en su dominio pueden formularse problemas que requieren juicios subjetivos sumamente sutiles. Gray, Marsha y yo tenemos la intención de darle a nuestro programa muy poca información aritmética de detalles sobre los enteros. Así, por ejemplo, el programa no será capaz de reconocer que 9 es cuadrado; en realidad, ni siquiera queremos que sepa multiplicar. Tampoco queremos que sepa que 6 es par y 7 impar. ¿Qué será, entonces, lo que sí deba conocer? Tendrá que saber contar progresiva o regresivamente, es decir, deberá disponer del concepto de sucesión. Así, por ejemplo, tendrá que reconocer que la sucesión de cifras 12345 representa un proceso de cuenta progresiva. Deberá ser capaz de aplicar la noción de recuento a las estructuras que esté mirando, como en 44444, que deberá reconocer como grupo de cinco copias de la cifra 4. Sabrá que 9 es mayor que 4, pero no tendrá idea de cuántas veces. Se puede estimar que el programa tendrá la madurez matemática de un niño de cinco años que mostrase ávida curiosidad por las pautas y series numéricas. He aquí el primer problema, ideado, como muchos otros, por Gray.

Fijémonos en la estructura que llamaremos *A*: 1234554321.

Fijémonos ahora en la estructura *B*: 12344321.

La cuestión es; ¿Qué es a *B* lo que 4 es a *A*? O con terminología de roles: ¿Qué cosa hace en *B* el papel que el 4 desempeña en *A*?

Notemos que, formulada de este modo la cuestión, estamos dejando a cargo del interlocutor decidir qué papel desempeña el 4 en la estructura *A*. Sería lo mismo que preguntar, "¿Quién es la Nancy Reagan de Gran Bretaña?" De esta forma pedimos al interrogado que determine, desde el punto de vista conceptual, cuál es el papel que Nancy Reagan desempeña, y que trate luego de exportar dicho papel a Gran Bretaña. He comprobado que muchas personas encuentran perfectamente aceptable que Denis Thatcher sea "el Nancy Reagan inglés", protestando en cambio que se le llame "Primera Dama inglesa". Un aspecto curioso, sobre el que volveré más adelante, es el siguiente: si el rol se deja implícito, sin enunciarlo verbalmente, se transfiere más fluidamente que "congelado" en una frase.

La verdad es que casi todas las analogías se nos presentan por vía no verbal. Raramente nos preguntará nadie "¿Cuál es el equivalente en Barcelona del Parque del Retiro?". Por lo común, el discurso mental sigue canales menos explícitos. Quizá se nos ocurriera el Parque de la Ciudadela; podríamos entonces enumerar características comunes a ambos. La mayoría de las analogías surgen de manera parecida, como resultado de filtraciones y percepciones que son luego inconscientemente organizadas, y no, en cambio, como soluciones conscientemente buscadas a rompecabezas más o menos preparados. Dicho en dos palabras, cuando una cosa nos recuerda algo, es que hemos formulado inconscientemente su analogía.

Incidentalmente, cuando por primera vez pensé en escribir sobre roles y analogías, tenía en la mente tanto el ejemplo de la "primera dama" como los ejemplos numéricos. Al ir madurando mis ideas me di cuenta de que inconscientemente había establecido un paralelismo entre ambos tipos de ejemplos. He llamado a estos paralelismos "meta-analogías", pues son analogías entre analogías. En esta meta-analogía yo veo la estructura *A* en correspondencia con los Estados Unidos, la estructura *B* con Gran Bretaña, el *4* como Nancy Reagan, y el objeto desconocido como la persona desconocida.

Echemos ahora una ojeada a posibles respuestas del primer problema "formal". La respuesta más verosímil parece ser 3. La justificación es que el 4 antecede al par central (55) de *A*, y que el 3 precede al correspondiente par central de *B* (44). ¿Qué decir entonces en *C*?

C: 12345666654321

El par central de *C* es 66, y está flanqueado por dos 6. ¿Debemos, pues, decir que 6 es a *C* lo que 4 es a *A*? Probablemente, para la mayoría de nosotros sería preferible el 5, aún siendo perfectamente *lógico* insistir en el 6. La preferencia por el 5 procede, empero, de una intuición muy razonable, la de generalizar la idea de "par central" (que es, desde luego, un rol) a "zona central" (o cualquier otro nombre que pueda ocurrírsele al lector). Tenemos aquí dos tendencias en conflicto: por una parte, la fidelidad a la noción primitiva; por otra, la de ceder y amoldarse "cuando viene al caso", cuando nos va a parecer excesiva tozudez y estrechez de miras seguir ceñidos a ideas preconcebidas, que, por otra parte, admiten generalización sencilla y "natural". Mas, ¡ay! estos conceptos —"ceder", "amoldarse", "venir al caso"...— son sumamente difíciles de incorporar a programas de ordenador.

Examinemos ahora algunos otros procedimientos para sacar punta al papel del 4. Fijémonos en la siguiente estructura:

D: 11223344544332211

Vemos aquí una curiosa inversión. No hay ahora par central; el resto está organizado por pares. Algunos seguirían tomando 4, por ser la cifra más próxima al centro. Mas, ¿por qué no tomar 44, es decir, un par en lugar de una sola cifra? Tal parece que, mientras "pares" y "singuletes" vayan permutando sus puestos, podríamos llevar las cosas hasta el final y reflejar en nuestra respuesta este giro perceptual. Más todavía, empeñarse en resolver la papeleta con sólo una cifra más parece tozudez y falta de imaginación cuando es tan evidente que la descripción más sencilla de *D* es agrupar por pares:

D: (11)(22)(33)(44)5(44)(33)(22)(11)

No solamente el 4, sino cada parte de *A* tiene rol propio, y *D* contiene otros tantos roles correspondientes. Como podemos ver, en cada rol los papeles de par y singulete han quedado intercambiados.

Esta puede ser tan buena ocasión como cualquier otra para señalar algunos rasgos de la meta-analogía ya aludida entre estos problemas y el problema de la "primera dama". Imaginando al presidente como "persona de más alta y central posición del país", y a su esposa como "la situada a su lado", nos damos cuenta de que esta caracterización se traduce casi literalmente a las estructuras de cifras. En *A*, la cifra "más elevada y central" —la "presidenta"— es 5 (o posiblemente, el par 55) y su "cónyuge", a su vera, es 4. En *B* el presidente es 4 (o si se quiere, el par 44) y su esposa es 3. En C el presidente es 6 (o el grupo de cuatro veces el número 6), y su esposa, 5. En *D*, por primera vez el presidente está unívocamente determinado (5), aunque, para compensar, la esposa admite varias posibilidades. Imaginando que los pares equivalgan a hombres y los singuletes numéricos a mujeres, en el caso *D* los papeles de unos y otras están permutados, exactamente como en el problema de la primera dama británica. La respuesta más razonable parece ser "el cónyuge"

(en este caso, el "marido") de 5, o lo que es igual, el par 44.

Examinemos ahora el siguiente par de casos curiosos:

E: 12345678

F: 87654321

¿Qué podemos decir ahora? Personas de esquemas muy rígidos podrían aferrarse a la idea plasmada en la frase "número situado a la izquierda del par central", pese al hecho de que en estos ejemplos los pares centrales no muestran ningún rasgo distintivo. Semejantes personas darían respuestas tan inanes como 3 para la estructura *E* y 6 para la *F*. Como ya dijo Lewis Carroll en cierta ocasión, a personas así más les vale dedicarse al fútbol y olvidarse de las analogías. Mas, ¿qué otra respuesta podría ser mejor, por ejemplo, en el caso *E*? ¿Cómo poner en correspondencia *E* con *A*? La aplicación (en sentido matemático) de *E* sobre *A* está condenada a ser imperfecta, así que ¿cómo determinar la mejor de las posibles? Podríamos pensar en amoldar *E* con la mitad izquierda de *A*; ello conlleva admitir tácitamente que es lícito renunciar a poner en correspondencia *E* con la *totalidad* de *A*, a cambio de la fácil salida de adaptar *E* con una porción "natural" de *A*. Me atrevo a decir que decisiones de esta naturaleza requieren juzgar con sutileza y sagacidad. Yo sugiero que debemos responder 7. ¿Qué pasa entonces con *F*? ¿Nos decidiremos por el 2 o por el 7? Depende de que nos propongamos aplicar *F* sobre la mitad derecha o la mitad izquierda de *A*. Poner en correspondencia *F* con la mitad izquierda requiere asociar una sucesión decreciente con otra creciente. En cualquiera de estas opciones hay que estar dispuestos a dejar escapar cualidades que parecieron importantes, a ceder con donaire ante las presiones y dificultades. ¡La fluidez de las analogías no se presta a buen juego cuando las ideas son rígidas!

En esencia, las situaciones de este tipo son difíciles porque obligan a escindir el rol del 4 en *A* en dos facetas antagónicas. Al poner en correspondencia *A* con *F*, en una de las facetas vemos al 4 desempeñando el papel de "uno menos que el presidente", mientras en la otra es contemplado como "cifra consecutiva a la más alta de una escala". Por tanto, en una de las facetas se resalta el valor numérico de la cifra, mientras en la otra se carga el acento en su posición. Según encontremos más relevante uno u otro aspecto, así será la respuesta que demos en *F*.

Nos tropezamos ya con escisiones que en gran medida son de este tipo al ver de aclarar si la primera dama británica era la reina Isabel, o Margaret Thatcher —o uno de sus maridos—. ¿Cuál de estos rasgos dará más verosímilmente carácter de "primera dama" al cónyuge de un personaje: ser símbolo impersonado del Estado, o encabezar su gobierno? En los Estados Unidos ambos rasgos son concurrentes en una misma persona (el presidente), pero en Gran Bretaña no es así. Fijémonos en las siguientes estructuras-problema:

G: 5432112345

H: 123465564321

En *G*, lo que es más central es al mismo tiempo lo de mínimo valor, y lo que es máximo es, a la vez, lo más periférico. (Gráficamente, *G* sería un valle, mientras que *A* es una montaña.) Tenemos una "figura ceremonial" (los 5 que flanquean la estructura) y tenemos una "cabeza del estado" (los dos unos centrales). ¿Cuál será el "cónyuge" que mejor se adapte al papel de "primera dama"? O, para no perder de vista como empezó todo esto, ¿qué cosa hace en *G* el papel que 4 hace en *A*? Por mi parte considero que el 2, por ser inmediatamente adyacente al grupo central; para mí, el carácter "central" tiene aquí más importancia que el valor numérico, al igual que el poder político me parece más sustantivo que la preeminencia puramente protocolaria. Consiguientemente, yo optaría porque la "primera dama" británica fuese Denis Thatcher, y no el príncipe Felipe.

¿Qué sucederá, pues, cuando nos metamos con *H*? Parecen existir tres posibilidades igualmente "razonables" (según el proverbial "sentido común"); a saber: 6 (por flanquear al par de cincos centrales), 5 (por ser el número inmediatamente inferior al máximo) y 4 (por flanquear el "cráter" central 6556). Como ya hemos visto otras veces, no disponemos de respuesta única y gloriosamente exacta, pero, desde luego, sí hay razones que parecen válidas y otras de aspecto deleznable. Por ejemplo, si alguien tuviera la audacia de afirmar "la respuesta tiene que ser 4, porque 4 es el cuarto término de *H* y también es el cuarto término de *A*", nos dejaría estupefactos. ¿Qué importancia podría tener una caracterización tan banal y arbitraria como "ser el cuarto término de"? Semejante enfoque no parece dedicarle a la estructura de *A* sino la más superficial de las miradas; algo así como decir que un "escarabajo" Volkswagen de color rojo y un mercedes rojo se asemejan entre sí más que dos "escarabajos" de colores distintos. Al fijarnos en el 4 tan sólo como cuarto elemento de *A* estamos echando por la borda todo cuanto *A* ofrece de interés; es reemplazar *A* por la estructura

4***

A nuestro juicio, las mejores respuestas deben insumir toda la riqueza de estructura de *A* con plenitud y sencillez.

La palabra "rol" nos obliga a pensar en los "papeles" de una obra teatral. En ellas, los diversos roles se entrecruzan y conjuntan en cuadros y escenas, donde coexisten e interactúan. En nuestros problemas de analogías podríamos ver de captar las dos estructuras implicadas como si fueran dos versiones de una misma escena, representadas por distintos intérpretes y dirigidas por distintas personas. Los roles fundamentales de la obra serían reconocibles en ambas versiones, pero simultáneamente cada una mostraría matices secundarios, es decir, roles, característicamente suyos. La clásica leyenda de Orfeo y Eurídice, adaptada al contexto contemporáneo en el carnaval de Río, ha servido de base a la película *Orfeo Negro*. Es imposible exportar directamente desde su contexto original muchas de las características de la leyenda griega, pero la modificación poética permite trasladarlas a nuestros días, y el director del filme, Marcel Camus, ha dado este paso con singular acierto.

Ahora que hemos examinado algunas variantes, me gustaría retornar al primer ejemplo numérico y hacer notar algunas de las sutiles ideas que contiene. Ante todo, la noción de "par central", que opera como piedra angular de la estructura *A*, es en realidad una especie de subproducto, un artefacto accidental de la estructura. ¿Cómo describiríamos la estructura *A* sin ir dictando una por una sus cifras? Seguramente diríamos que va creciendo de 1 a 5, para luego caer de 5 a 1, creando dos mitades que son imagen simétrica una de otra. Empero, con tal descripción sólo hacemos referencia a las mitades, y para nada mencionamos que en su punto de enlace éstas crean un par de cincos. Pese a lo cual, se produce un desplazamiento de la atención al leer la estructura *A*. Con el ojo de la inteligencia su aspecto podría ser:

1234*55*4321

De esta forma acabamos de crear en el centro de la estructura una nueva entidad conceptual. Como ya he hecho notar antes, esta entidad es la *piedra*

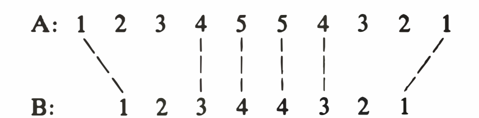
angular, la dovela de *A*. (Observemos que esta metáfora se basa, o implica, poner en correspondencia *A* con un arco de sillería.)

¿Por qué no percibimos también los dos 3 como formando una sola entidad? Probablemente, porque no están contiguos. Y fijémonos en la estructura:

1234512345

¿No es cierto que ahora el par central no destaca ni llama la atención como particularmente importante? En cambio, en *A*, la combinación de adyacencia e igualdad numérica, reforzada por el hecho de ocupar el par de cincos la posición central, provoca en la mente de quien la observa la idea de que los 5 forman una sola entidad.

En el primer ejemplo, tanto en *A* como en *B* saltan a la vista sendas mesetas centrales; este hecho sugiere un buen punto de partida para construir una aplicación de *A* sobre *B*: meseta central con meseta central, origen con origen, extremo con extremo... Sin embargo, es evidente que si tratamos de completar la aplicación vamos a tropezar con dificultades.



Parece forzoso que el 1 de *A* haya de corresponderse con el 1 de *B*, ¿no es cierto? Y los centros tendrán también que encajar uno con otro, ¿verdad? ¿En qué lugar, por tanto, de la sucesión de 1 a 5 tendrá que romperse la analogía? Parece ser que alguna clase de aplicación del 4 sobre el 3, como vemos arriba, le resulta satisfactoria a mucha gente. No obstante, si a estas mismas personas se les insiste en que den un paso más, se encogerán de hombros, sonreirán forzadamente, y lo dejarán por imposible.

Análogamente, aunque se puede preguntar quién es "la Nancy Reagan británica", tiene muy poco sentido preguntar "quién es la Maureen Reagan inglesa" (recuerde el lector que Maureen Reagan es hijastra de Nancy Reagan). Supongamos que del matrimonio Thatcher hubiera nacida una hija. ¿Sería esta joven la equivalente de Maureen Reagan? Imaginemos que Margaret Thatcher tuviera una hijastra. ¿Sería ésta la correspondiente a Maureen?

O bien, imaginemos que Margaret Thatcher no haya tenido hijas, pero que Denis Thatcher tuviera hijastras gemelas. ¿Serían estas gemelas, tomadas conjuntamente, la contrapartida inglesa de Maureen Reagan? Recordemos el ejemplo *D*, donde el par 44 tenía idéntico papel que el de un único 4 en *A*.

Podríamos ir más lejos, encarnizándonos en la búsqueda de analogías entre entidades inglesas y norteamericanas. ¿Qué suceso inglés sería homólogo del caso Watergate? ¿Quién pecharía con el papel de Richard Nixon? ¿A quién le tocaría ser John Mitchell? ¿Quién haría de senador Sam Ervin? ¿Y de senador Daniel Inouye? ¿Quién podría ser G. Gordon Liddy? ¿Y el juez John Sirica? ¿Quién John Dean? ¿Quién el agente Ulasewicz? ¿Y Alexander Butterfield? Cuanto menos destaque un objeto dentro de la estructura general, tanto más difícil resultará caracterizarlo de modo exportable.

Pero, ¿qué hace notable a un elemento? Por lo común es su proximidad o acercamiento a elementos "distinguidos" de la estructura ambiente. Fijémonos en la siguiente estructura:

111111111222233343333222211111111

Probablemente, el 4 central sea, individualmente considerado, la cifra más dintinguida. Ahora, según como sea percibida la estructura de la sucesión, saltarán a la vista unas u otras características. Por ejemplo, ¿qué ve Vd., "letras" o "palabras" (secciones "moleculares" de la sucesión)? Cuando la observo a nivel de "palabras", el grupo central 3334333 parece destacar muy poco menos que el 4, y, tras él, quizá situaría yo los dos grupos de unos de los flancos. A continuación vendrían los dos grupos de 333, tomado individualmente cada bloque. Tan sólo entonces son reconocidos los grupos de doses. Por otra parte, examinada la sucesión a nivel de "letras", los elementos conspicuos son muy diferentes. Tras el 4 del lugar central, en mi opinión los dos números más sobresalientes son, posiblemente, los unos primeros y últimos, por ser muy sencillo describirlos, y tras ellos, quizás los 2 primero y último. A continuación situaría yo los dos 3 que flanquean al 4 central; pero, a partir de aquí resulta cada vez más difícil especificar los diversos elementos sin recurrir a descripciones tan faltas de espíritu como "el cuarto término".

Un término distinguido es algo que podemos localizar mediante una descripción elegante, tersa, de aspecto exportable. Un término casi-distinguido es algo alcanzable situando primero un término distinguido, y después, partiendo de éste, echando una "carrerilla" de itinerario exportable. Es lo que sucede al explicarle a otra persona el camino a seguir: ciertos lugares o construcciones destacan más que otros. En todas las grandes ciudades hay edificios o instituciones a las que es intrínsicamente fácil dirigirse, mientras que hay otros para los cuales es casi imposible explicar cómo llegar allá. De igual forma, ciertos roles de una estructura conceptualmente compleja sobresalen claramente y son exportables sin dificultad, mientras la descripción de otros es, en cambio, muy difícil.

En cualquier analogía, conforme nos vamos alejando de sus roles centrales la vamos sometiendo a esfuerzos y tensiones cada vez mayores. "¿Quién es la Jackie Washington británica?" ¿Deberíamos comenzar buscando la entrada "Washington, J." en la guía telefónica de Londres? ¿O sería más oportuno buscar "London, J."? ¿Carece de sentido la pregunta, es absurda incluso para el mejor amigo de Jackie? Después de todo, el rol de Jackie es demasiado pequeño, demasiado idiosincrático dentro de la compleja estructura de los Estados Unidos, y no es exportable. El hecho de ser Jackie la encargada del puesto de "hot-dogs" que la cadena Tuercaloca tiene en Patoburgo (Pa.) no nos sirve de gran cosa, porque ahora tendríamos que empezar traduciendo las identidades de Patoburgo y de la Cía. Tuercaloca al caso británico, y eso por no hablar del equivalente inglés del puesto de "hot-dogs".

La moraleja es sencilla: si en las analogías tiramos más de la manga que del hombro, acabarán inevitablemente por romperse. ¿De qué valen, pues, las analogías? ¿Por qué molestarnos en estudiarlas? ¿Qué propósito puede tener esforzarnos en crear correspondencias entre cosas que, en *realidad,* es imposible hacer corresponder exactamente? Yo ignoro la respuesta de estas preguntas, pero, sea cual fuere, es seguro que contribuye a nuestra supervivencia (o a la de nuestros genes), porque los humanos estamos continuamente ejercitándonos en ella. Analogías y reminiscencias, tanto si son precisas como si no, guían e inspiran todos nuestros esquemas de pensamiento; y entrar en resonancia frente a parecidos y semejanzas, por vagas que sean, es el sello distintivo de la inteligencia.

La forma en que usamos palabras y frases hechas muestra a las claras como nosotros encauzamos el mundo hacia un sistema de categorías bastante permanentes. Empleamos continuamente nombres comunes, como "perro". No hay dos perros que se correspondan idénticamente, y nos damos por contentos con la abstracción "perro", gracias a la cual podemos equiparar dos perros cualesquiera, cabeza con cabeza, rabo

con rabo, pelaje con pelaje, ojo con ojo, etcétera. Nuestro lenguaje permite crear correspondencias de los más diversos niveles de exactitud. Hay personas que no van más allá de la idea "perro", y en consecuencia es ésta la palabra que utilizan para todos; otras reconocen peculiaridades del animal tan prestamente como su "perritud", y les oímos decir, por ejemplo, "ese airedale, aquel fox- terrier". Poco importa el nivel de detalle al cual detengamos nuestro escrutinio; lo esencial es que la percepción consiste siempre en suprimir, filtrándolos, ciertos aspectos, y encauzar otros hacia una única "diana" u "objetivo" conceptual, hacia un símbolo mental que con frecuencia porta, como único distintivo, una palabra (como sucede con "palabra") o una frase hecha (tal como en "frase hecha"). Cada uno de estos símbolos mentales aloja, soporta y postula la evasiva igualdad compartida por todos los entes que por él son denotados.

Aparte las analogías implícitas y agazapadas tras cada palabra y cada lugar común, se dan continuamente, y con mayor deliberación, analogías explícitas en muchas de nuestras frases. Cualquier cuadriculado, parrilla o rejilla nos recuerda un damero o un tablero de ajedrez; cualquier acción de nuestras vidas que haya sido sopesada y planeada es comparada a una jugada de ajedrez. Asimilamos el ojo con una cámara fotográfica; a los átomos, con minúsculos sistemas solares. Constantemente se emplea la imagen de un vasto rompecabezas como metáfora de la ciencia (analogía que nunca me ha hecho ni pizca de gracia). En nuestra avidez por estirar y retorcer los conceptos estamos dispuestos a transformar nombres propios en comunes, como al decir "Brigitte Bardot es la Marilyn Monroe francesa". En giros lingüísticos semejantes, los roles de Brigitte Bardot y de Marilyn Monroe han de sufrir un poco en beneficio de la viveza de figuración del lenguaje.

A continuación, un paso más allá del nivel lingüístico explícito, están las analogías y correspondecias de que continuamente nos servimos como guía de nuestro pensamiento a mayor escala. Cuando alguien nos confiesa un pesar amoroso, por lo común podemos contrastarlo casi inmediatamente con algunas de nuestras propias experiencias, y ello pese a ser las cuestiones de amor sumamente específicas e idiosincráticas. La explicación reside en que nosotros desechamos y eliminamos muchísimos detalles; espumamos ciertas ideas abstractas, teniendo buen cuidado de no llevar demasiado lejos el parecido. Y por supuesto, borrando de un escobazo todos los detalles triviales.

Así pues, la razón de interesarnos por el pensamiento analógico es que lo tenemos en nosotros. No tenerlo en cuenta sería como olvidar el Everest al tratar de comprender el montañismo.

Retornemos al dominio de los números, y examinemos algunos problemas concretos. He aquí cuatro ejemplos más:

I: 123345676543321

J: 177654321

K: 697394166

L: 123456789789654321

En el ejemplo *I* aparece un rol que me ha parecido natural llamar "un gobernador", a saber, el par 33. Como otras veces, uno de los roles contenidos en *A* ha quedado escindido en dos: en *A* el par 55 no solamente era el único par, sino también la cima de la montaña; en *I*, por el contrario, 33 es el único par y el papel del "pico" lo desempeña el 7. Nos vemos entonces obligados a elegir entre el 2 (la esposa del gobernador) y el 6 (la esposa del presidente). En realidad, el gobernador tiene dos "esposas" (2 y 4) y por tanto tendremos que optar por una de ellas, a menos que nos decidamos por el 6, como esposa que es del 7, el presidente.

El ejemplo *J*, al comenzar por 1776 tiene en los Estados Unidos un carácter patriótico. ¿Cuál sería su homólogo británico? Mas su interés reside, sobre todo, en que por primera vez nos hace notar la simetría de *A*, que hasta ahora tomábamos por segura. Cuando allí decidimos que el 4 hacía de esposa del presidente, ¿lo hicimos porque lo *precedía* o porque lo *seguía* inmediatamente? De haber sido lo primero, el homólogo de 4 podría ser el 1 inicial, mientras lo segundo sugiere que tomemos el 6. Y esta última hipótesis, que, aunque todo lo demás fuese idéntico, probablemente sería la más débil, queda aquí reforzada por la regularidad del descenso de 7 a 1, que se corresponde mucho mejor con la regularidad del descenso de 7 a 1, que se corresponde mucho mejor con la segunda mitad de *A* de lo que la escarpada pared que *J* muestra en su comienzo (¡de 1 a 7 en sólo un paso!) se corresponde con la primera mitad de *A*.

El ejemplo *K* es principio bastante oscuro, aunque a la vista del ejemplo *J* cobra algún sentido. Entre otras cosas, *J* nos ha hecho prestar atención a la presencia de dos cuatros en *A*, y no de uno sólo. El ejemplo *K* juega con la relación mutua entre estos dos cuatros; podemos considerar que tal propiedad define el papel del 4 en *A*. Claro que no es ésta la única relación entre ambos 4; pero sí es la más evidente. (Pensemos en *A* como si fuera ***4**4***.) ¿Qué número aparece por dos veces en *K*, separado por dos cifras situadas en el centro? Me imagino que deberíamos optar por el 9.

Finalmente, echemos una ojeada al ejemplo *L*. En él, la noción de par central ha quedado generalizada, dándose un paso más en el proceso de abstracción. Vamos confiadamente subiendo paso a paso, hasta toparnos con el segundo 7. Damos un traspié, ¡caemos al vacío! Tardamos un momento en recobrar el control; nos damos cuenta entonces de que el par central no está formado por cifras individuales, sino por "piñas" o "tacos": dos ejemplares de la sección 789. Para mayor claridad, reagruparemos así la sucesión:

L: 123456(789)(789)654321

Al hacerlo así, el fulgor de la respuesta es deslumbrante: es el 6. Por otra parte, quizá se esperaba que supiéramos sacar partido de la indicación tan generosamente proporcionada por el par central, a saber, que la sucesión completa, y no sólo su centro, puede ser organizada en ternas. De hacerlo así, *L* se nos presenta como

L: (123)(456)(789)(789)(654)(321)

También la respuesta debería ser ahora evidente —a excepción de un pequeño dilema: ¿tomaremos la primera dama situada a la diestra del presidente (654), o la situada a la siniestra (456)? Siendo prejuicio habitual entre nosotros la ordenación de izquierda a derecha, yo me inclinaría por (456). Por otra parte, muchas personas se resisten a considerar la sucesión descompuesta en ternas, y siguen prefiriendo la respuesta 6.

Veamos ahora un problema de inocente aspecto que apunta, sin embargo, hacia más profundas cuestiones:

M: 123457754321

A mi modo de ver, una respuesta muy defendible sería 6. Alguien pudiera objetar, "¿El seis? ¡Pero si ni siquiera figura en la serie!" Así es, desde luego, pero justamente su ausencia lo hace más conspicuo. En la sucesión *A*, el 4 precede al 5 no sólo tipográficamente sino también en el orden abstracto, pues 4 es el predecesor numérico del 5. ¿Y qué es el 5 en *A*? Podríamos considerarlo bien como el máximo de los valores que figuran en la sucesión, o bien como

la cifra que compone el par central de A. Ambos papeles se transfieren sin dificultad a M, quedando asignados al 7. Si ahora optamos por ver el papel de 4 en A desde un enfoque aritmético y abstracto, en vez de tipográfico y concreto, podremos aplicar sin dificultad el mismo enfoque en M. De esta forma, el 6 se convierte en rival muy serio para el 5.

Este ejemplo inaugura todo un universo de nuevos niveles de abstracción en la percepción de estructuras. Para ilustrar brevemente lo que sucede, propondré las siguientes estructuras:

N: 1234445678987654444321

O: 1112343211

Permítanme proponer un problema asociado a ellas: ¿qué elemento de O representa el mismo papel que el 7 tiene en N? Está claro que el 7 figura dos veces en N, pero el problema es que no parece mostrar ninguna singularidad especial. Como una de las cifras que componen N, el 7 no muestra rasgos sobresalientes, y por eso, parece a primera vista que será difícil trasladar su rol a la segunda estructura. Sin embargo, el número 7 sí interviene de otra forma en la estructura de N, y esta segunda forma sí es destacada. Uno de los rasgos más llamativos de N es el gran número de cuatros que contiene: nada menos que siete. Por esto, el 7 en su capacidad de número *cardinal* —y no como mero signo tipográfico— sí tiene destacado papel en la estructura N. ¿Será posible exportar a O este nuevo rol?

Tenemos que decidir cómo caracterizar (de forma exportable) qué es lo que 7 está contando. Señalar "el número de cuatros" nos parece de gran estrechez de miras, por decirlo amablemente. Quizá sea un poco mejor "el número de veces que figura el término más abundante". Después de todo, el 4 sí destaca en N, y ello, por su abundancia. Nos damos cuenta entonces de que el 1 hace en O el mismo papel que el 4 en N. Por consiguiente, el homólogo del 7 de N será el número de unos que figuren en O, es decir, 5. Una solución que pudiéramos llamar "invisible", pues el 5 no figura explícitamente entre las cifras de O.

Mas nos parece que no debe insistirse en que haya diferencia esencial entre la presencia manifiesta de un número —como signo tipográfico— y su presencia implícita en un sentido más abstracto, por ejemplo, como número cardinal; hacerlo sería dar prueba de cerrazón mental. Con otras palabras, el 5 solamente es invisible en O si se considera que en la visión no intervienen elementos cognitivos, como si todo lo que pudiéramos percibir fuesen las cifras de los numerales. Gran miopía sería ésta. En realidad, a través de nuestros ojos estamos "viendo" constantemente cualidades abstractas. Cuando vemos un programa de televisión vemos mucho más que líneas y puntos brillantes u obscuros: vemos personas. Si nos paramos a pensarlo, la verdad es que no vemos las líneas para nada: vemos solamente las personas. Es obvio que enraizados en algún lugar del proceso conocido por "visión" hay elementos donde las líneas son percibidas como tales; pero, irónicamente, nos lo pensaríamos mucho antes de adscribir la "visión" a las funciones que puedan desempeñar las células retinales o las de cualquier otro tipo. La visión exige *ver más allá de las líneas,* del nivel de sensación primitivo. Así, podemos "ver" que cierta posición de una partida de ajedrez es preocupante; que una cierta pintura es de Picasso, que una persona se encuentra de mal humor, y así sucesivamente. Si aceptamos la idea de que la visión está imbuida de elementos cognitivos, tendremos que ponernos de acuerdo en que es preciso "mirar más allá de las cifras". ¡Y descubriremos que el 5 "salta a la vista" en O!

Incidentalmente, al construir N tuve buen cuidado en que la cifra 7 figurase en la sucesión (así como de que 7 fuera el número de cuatros). Ello suscitó una complicación, algo que era preciso no tener en cuenta. Pude haber hecho que N contuviera 12 veces la cifra 4, en cuyo caso el 12 "aparecería" en N tan sólo a nivel abstracto, como número cardinal, y no como cifra. Empero, pocas veces la vida real es tan pulcra. Por ejemplo, al pensar en la cuestión: "¿Quién es la Nancy Reagan de Inglaterra?" es posible que tenga Vd. la impresión de que es problema mucho más difícil que "¿Quién es la Primera Dama de Gran Bretaña?" seguramente porque asociamos con Nancy Reagan ciertos rasgos personales además, y por delante, de verla como primera dama de los Estados Unidos. ¿Qué habría sucedido de preguntar yo por "la Eleanor Roosevelt británica"? O volviendo las tornas, "¿Quién sería el Moshe Dayan norteamericano?" Estuve a punto de responder "Douglas Mac Arthur", quien, como Dayan, fue renombrado y victorioso general además de controvertida figura política. ¡Pero Mac Arthur no era tuerto! Y, sin duda, el rasgo más llamativo de Dayan es su negro parche.

Conviene retornar a ejemplos anteriores, ponerlos en correspondencia con N y preguntarse "¿quién hace aquí el papel del 7?" Percibiremos entonces aquella estructura ya conocida bajo nueva luz. Dejaré unos cuantos ejemplos que desafiarán el ingenio del lector, quien debe tratar de ponerlos en correspondencia con A y con N.

P: 5432154321

Q: 543211234554321

R: 12349876543

S: 1122334455667712177654321

T: 1234123121213214321

U: 211221222291232

Quizá le resulte entretenido preparar unos cuantos ejemplos de su propia cosecha, que lleven a quien pretenda resolverlos al descubrimiento de nuevas e inesperadas modificaciones del papel que 4 representa en A. Por ejemplo, ¿sabría el lector preparar un ejemplo donde sea razonable describir el 4 como cuarto término de A?

Una de las finalidades de las charadas anteriores ha sido echar por tierra la presunción de que el concepto de rol, en su sentido más pleno, rico e intuitivo, como el rol representado por 4 en la sucesión A, o el papel de "primera dama", puede ser fácilmente plasmado en una definición. En realidad, podría ser mucho más exacta la afirmación contraria: que la flexibilidad y fluidez de la noción de rol reside en la imposibilidad de capturarla mediante descripciones verbales. Tenemos aquí una idea importante. Parémonos a pensar cómo podríamos captar con una frase lo que 4 está "haciendo" en A. No importa lo que digamos; siempre habrá alguien capaz de aderezar otro ejemplo donde nuestra definición no permitirá a nadie predecir qué será lo que nosotros percibamos como análogo del 4. Una frase es como una instantánea: da perfectamente el parecido en un instante dado, pero no puede mostrarnos cuál será el desarrollo posterior de la escena. La mente internaliza los roles de forma muchísimo más fluida. En la definición del rol hay varias características potencialmente importantes, pero en tanto no aparezca un ejemplo que destaque explícitamente tales rasgos, no saldrá a la luz la importancia de los mismos.

Estamos constantemente haciendo comparaciones. Alguien entra por vez primera en nuestra cocina; no parece merecer especial interés que diga: "Me gusta como la tienes distribuida; está mejor que la mía. En mi cocina las ventanas dan a *ese* lado y los fuegos están *aquí*, por eso la distribución no es

tan buena. Además, por las mañanas no da tanto el sol como en ésta". Es evidente que "ese lado" y "aquí" reflejan una superposición mental de ambas cocinas.

Al parecer, lo que se necesita urgentemente en inteligencia artificial es alguna forma de ir más allá de los programas del tipo "función delta": programas que son auténticos virtuosos en dominios muy restringidos, pero que carecen de adaptabilidad y flexibilidad, de tolerancia con los errores. He llamado a estos programas "programas AE"; son programas "artificialmente expertos". Mas, no obstante su virtuosismo, son frágiles y poco de fiar. En mi opinión, un estudio cuidadoso de los procesos de formación de juicios, incluso en un dominio tan limitado como el de estas curiosas analogías numéricas, permitirá lograr fascinantes intuiciones de cómo lograr que los programas de ordenador se vayan acercando a la flexibilidad y generalidad de nuestras propias mentes.

Para mejor mostrar lo que pretendo decir, me tomaré la licencia de transcribir, casi literalmente, una conversación que hace un rato tuve con un amigo. Fue como sigue:

Amigo: El viernes pasado, estaba yo por la tarde oyendo la radio en el club de Petapoucos. Tocaban una pieza que estaba seguro era de Shostakovich. Al terminar, cuando el locutor dijo su autor, resultó que no me había equivocado. Me gustó que así fuera, porque eso sólo me ha ocurrido un par de veces en toda mi vida.

Yo: ¿Te refieres a estar en el Club de Petapoucos oyendo la radio, y que lo que tocaban te haya parecido de Shostakovich?

Amigo: ¡Mira que eres cazo! ¡Cuando los de *Investigación y Ciencia* lean esto es probable que no te den más ocasión de escribir para ellos!

Yo: ¡Ya caigo! ¡Debí darme cuenta de que podía no haber sido viernes por la tarde!

Amigo: ¡Debiste darte cuenta de que la pieza pudo no ser de Shostakovich!

Por pura coincidencia estaba prestándonos oído un programa de ordenador, llamado CORTEX, que funciona con lenguaje natural y acaba de ser puesto a punto. Estábamos en el punto anterior de nuestra conversación cuando el programa no pudo resistir más y terció en ella, diciendo, "Vaya, hombre, eso me recuerda algo muy parecido que me ocurrió el otro día. Estaba yo en el club cuyo nombre empieza por *P* cuando se rompió el refrigerador de agua... No me dirán que no es casualidad!" Pues bien, *ese tipo de cosas* es lo que por mi parte me gustaría que supieran hacer los programas de inteligencia artificial.

Taller y laboratorio

Mecánica de fluidos en rollos de miel y jarabe

Jearl Walker

Cuando se vierte miel, de modo que caiga formando un chorro fino sobre un pequeño charco de la misma miel, casi siempre se observa que el fluido forma un rollo sobre la superficie del charco. Entre otros fluidos viscosos que se comportan así, se encuentran los jarabes, la cola de pegar, los aceites y el chocolate líquido. Otra posibilidad es que el fluido, en vez de arrollarse, se pliegue en vaivén sobre sí mismo a la manera de una cinta, o que se repliegue en espiral de cualquier otra forma.

El primer estudio de estos fenómenos lo realizó, a finales de los años cincuenta, George Barnes, actualmente la Universidad de Nevada en Reno, junto con dos de sus alumnos, James MacKenzie y Richard Woodcock. En sus investigaciones emplearon un aceite espeso (aceite para transmisiones n.º 140) que vertían sobre un plato. Cuando la sección recta del chorro era circular, el chorro formaba un rollo al llegar al charco; si el chorro era más bien aplanado, al haber sido vertido por encima de un borde, semejaba una cinta que estuviera plegándose. Y cuando el chorro caía sobre una superficie inclinada, formaba un número ocho o un dibujo parecido a un pétalo.

La frecuencia de arrollamiento dependía de la altura de caída: más seguido cuanto mayor era el salto. Para grandes distancias, esta relación resultó ser lineal, pero más complicada para distancias menores. La observación del rollo exigía un salto de altura mínima, pues, si era inferior a ésta, el fluido penetraba en el charco sin arrollarse. Si la altura de caída superaba ese mínimo, el chorro llegaba a la superficie a una celeridad superior a la que el charco podía absorberlo y, así, comenzaba a formar un rollo.

Cuando el chorro caía desde muy alto, el arrollamiento generaba un cono que se elevaba levemente por encima de la superficie del charco. Los chorros que se arrollaban deprisa solían producir conos de cierta altura, aunque ésta nunca superó el centímetro. En la cima de tales conos se formaba una cavidad mientras el chorro se arrollaba en ella.

Barnes observó que las partículas de un chorro no describían hélices en torno al eje geométrico del chorro, sino que estaban confinadas cada una en un plano vertical. Al acercarse una partícula a la zona de arrollamiento, se desplazaba lateralmente separándose del eje, antes de proseguir hacia la superficie del charco. Introduciendo partículas de aluminio en el chorro, Barnes intentó seguir el movimiento de determinadas partículas del fluido, pero se movían demasiado rápidas para observarlas.

Recurrió entonces a un estroboscopio, cuya luz dirigió sobre el chorro. Una vez igualada la frecuencia de los destellos a la de arrollamiento del chorro, cada destello iluminaba el chorro en la misma posición de arrollamiento, con lo que el rollo parecía inmóvil. Cuando la frecuencia del estroboscopio se desacompasaba un poco con respecto a la de arrollamiento, el rollo parecía girar lentamente. Con este refrenamiento aparente, Barnes consiguió observar un rollo que giraba a gran rapidez.

Las investigaciones siguientes acerca del arrollamiento de los líquidos las llevó a cabo Geoffrey Ingram Taylor, uno de los primeros investigadores de dinámica de fluidos de este siglo. Atribuyó el arrollamiento a la compresión mecánica que sufre el chorro viscoso cuando éste se acerca a un charco del fluido a una velocidad moderadamente elevada. A causa de la aceleración gravitatoria, la velocidad del chorro aumenta durante la caída; además, el chorro se estrecha. Estos dos efectos aparecen en la explicación del arrollamiento dada por Barnes.

Para comprender la razón del estrechamiento, comparemos las celeridades del fluido cuando atraviesa dos rebanadas transversales del chorro, una cercana al pie y otra cercana al inicio. El volumen de fluido que atraviesa por segundo cada rebanada debe ser el mismo, aunque en la rebanada inferior la velocidad será mayor que en la superior. Entonces, como el volumen que atraviesa por segundo cada rebanada debe ser el mismo y, además, en la rebanada inferior la velocidad es mayor, el diámetro de la rebanada inferior habrá de ser menor.

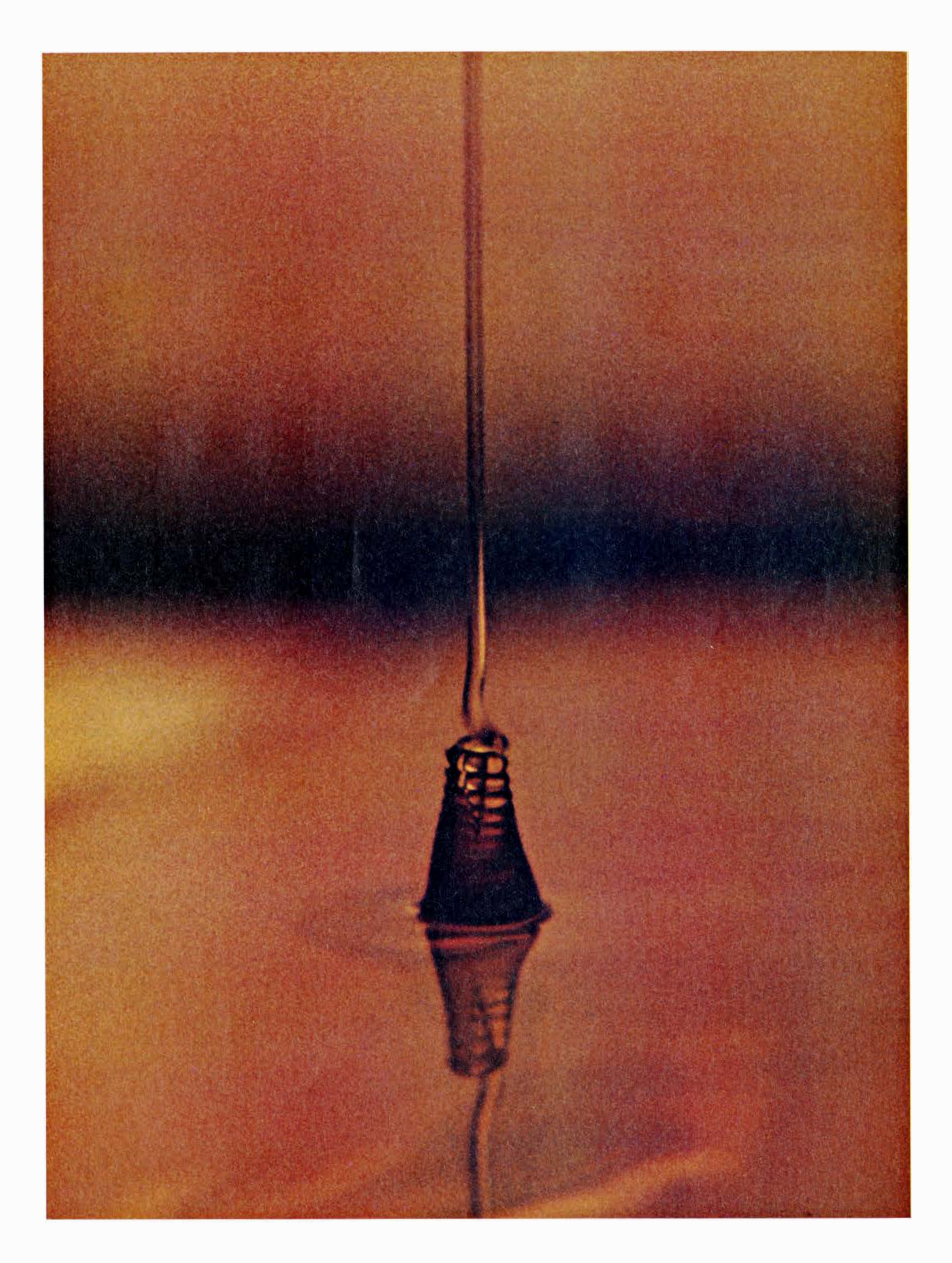
Si el chorro se mueve más deprisa de lo que permite la entrada de fluido en el charco, el chorro comenzará a aminorar su velocidad y a ensancharse un poco antes del charco. Así, todas las partículas que atraviesen la sección más estrecha del chorro deberán reducir su velocidad. De esta deceleración será responsable una compresión actuante en la zona del chorro situada inmediatamente debajo de la sección más estrecha. La compresión es la fuerza por unidad de superficie de la sección transversal del chorro; es mayor en la sección más estrecha porque ésta posee una superficie menor. Entonces, si el chorro es suficientemente estrecho, la compresión hará que pandee hacia un lado.

El chorro desviado pandeará todavía más en una dirección tal que se iniciará un movimiento circular en torno al eje central del chorro y comenzará el arrollamiento. Irá luego penetrando nuevo fluido en la zona de pandeo, en espera de que le llegue su turno de entrar en el charco, y el chorro describirá círculos alrededor de su eje.

La frecuencia de arrollamiento depende de lo estrecho del chorro. Los chorros estrechos pandean lateralmente sólo un poco, por cuya razón los radios de los rollos correspondientes son pequeños. Por otra parte, como la celeridad de las partículas de los chorros finos es relativamente alta, el fluido se arrollará en torno al eje a gran frecuencia.

En los chorros cuya zona estrecha es algo más dilatada, aumenta el pandeo lateral, generándose rollos de radios mayores. Que decaiga la frecuencia de arrollamiento obedece a que remite la celeridad de las partículas de fluido con un chorro más ancho. El grosor de la porción más estrecha del chorro depende del grosor del chorro cuando éste abandona el recipiente y de la altura de caída. Con otras palabras, si nos ocupamos de chorros que salgan por un orificio de tamaño fijo, sólo importará la altura.

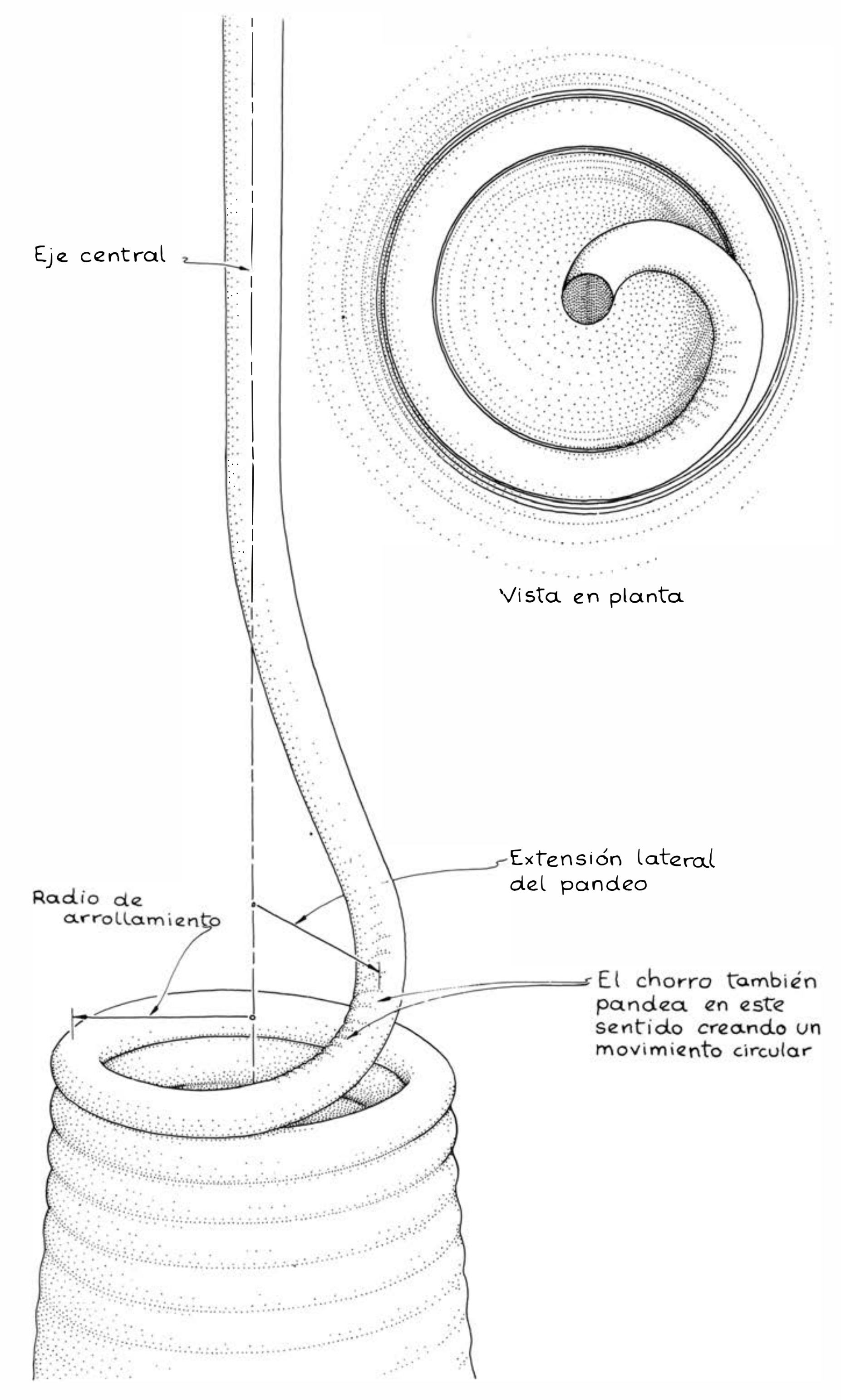
Supongamos que, al principio, el recipiente se encuentra inmediatamente



Rollo formado por la caída de un chorro de jarabe de maíz sobre una superficie del mismo fluido

sobre el charco, y luego lo vamos elevando. Inicialmente, la altura de caída será muy corta para que se produzca arrollamiento. Cuando éste comience a formarse, el chorro será todavía bastante ancho, incluso en su zona más angosta; los rollos tendrán un radio grande y la frecuencia de arrollamiento será baja. A medida que se eleve el recipiente, se estrechará la sección más delgada del chorro, disminuirá el radio de los rollos y aumentará la frecuencia de arrollamiento. Finalmente, la altura llegará a ser tal que el chorro se separará en gotas.

Para sus investigaciones, Taylor empleó sobre todo chorros de glicerina. Cuando ésta caía a través del aire, su aceleración era la aceleración de la gravedad, o sea, g. Para conseguir otras aceleraciones Taylor vertía chorros en el seno de fluidos menos viscosos. Con ello, la aceleración era inferior a g, pues el fluido circundante introducía un empuje ascendente. Calculaba la aceleración resultante comparando la densidad específica del chorro con la del fluido circundante. (Como la densidad específica de la glicerina es 1,255 y la del agua pura es 1, la diferencia de 0,255 nos dice que la aceleración de un chorro de glicerina que caiga en el seno de agua pura será 0,255 g.)



Lugares de interés en un chorro arrollado

En tales condiciones, la velocidad del chorro no aumentará con la rapidez que lo hace en el aire. Pensemos en un experimento imaginario diseñado para comparar el arrollamiento en ambos casos. La glicerina se vierte a través del mismo orificio y desde la misma altura. Cuando caiga a través de aire, se arrollará a una cierta frecuencia; cuando lo haga a través de agua, la frecuencia de arrollamiento será menor porque, inmediatamente encima del charco de glicerina, el chorro se mueve de un modo más lento que en el aire.

Otra cosa que hizo Taylor fue lanzar un chorro de glicerina por entre dos capas de fluido, ambos menos densos que la glicerina. Al pasar de la primera capa a la segunda, el chorro se arrollaba. Ello se debía a que la densidad específica de la primera era menor, como lo mostraba el hecho de que flotara sobre la segunda. Efectivamente, en la primera capa la aceleración del chorro era mayor que en la segunda y, si la variación de la aceleración en el límite de separación alcanzaba unos valores bastante altos, el chorro sufría una compresión al traspasar el límite. En el caso de que el chorro en ese punto resultara suficientemente delgado, pandeaba y se arrollaba cuando atravesaba la capa inferior.

En el momento en que un chorro comienza a arrollarse, su velocidad de descenso varía. El cociente entre ambas velocidades depende de los diámetros del chorro y del rollo; este cociente es igual al diámetro del chorro dividido por el producto del número pi por el diámetro del rollo.

Al disponerme a estudiar, por mí mismo, el arrollamiento de líquidos viscosos, me procuré un acuario, en cuyo interior coloqué un soporte de laboratorio que sujetaba un vaso de papel. Bajo éste puse una pequeña plataforma de plástico, sobre la que caía un chorro de líquido procedente de un orificio practicado en el fondo del vaso. Con la plataforma conseguía que, al fotografiar los chorros mientras fueran arrollándose, los rollos tuvieran siempre la misma altura, ya que el fluido se escu-

rría constantemente hacia el exterior de la plataforma.

Abrí el orificio del vaso con la punta de un lápiz. Luego procuré que la parte del orificio interior al vaso quedase bien igualada, de modo que no hubieran orejetas de papel que alterasen el paso del fluido. El diámetro del orificio era de unos cuatro milímetros. El vaso, que ajusté ceñidamente en un anillo afianzado al soporte mediante abrazaderas, podía elevarlo o descenderlo manipulando en las abrazaderas.

Comencé mis ensayos con jarabe de maíz negro (fructosa). El chorro de ésta cayó atravesando el aire sobre el charco poco profundo de jarabe que había ya en la plataforma. La altura de caída era la distancia entre la plataforma y la superficie superior de la fructosa contenida en el vaso. (Efectivamente, a causa de la presión que ejerce un fluido sobre el fondo del recipiente que lo contiene, las partículas de jarabe llevaban, al pasar por el orificio, la misma velocidad que hubieran tenido al caer libremente desde una altura igual a la del fluido dentro del vaso.)

Cuando la altura de caída estaba comprendida entre siete y trece centímetros, el chorro se enrollaba al incidir sobre el charco. Para alturas inferiores no se formaba rollo. Para una altura mayor, la fructosa salía del vaso a borbotones, que insinuaban un arrollamiento, o se enroscaban de manera complicada, aunque no se observaba rollo continuo ni cono.

Aumentando bastante la altura de caída, el chorro se estrechó muchísimo inmediatamente antes de la plataforma, y formó en seguida un cono que sobresalía alrededor de un centímetro por encima de la misma. En el vértice del cono, el chorro se arrollaba tan rápidamente que no podía seguirlo con la vista. El sentido de arrollamiento podía ser cualquiera, pero una vez iniciado no se invertía.

Cuando acorté la altura de caída, el chorro adquirió cierto grosor inmediatamente antes de la plataforma; no se generó ningún cono y la frecuencia de arrollamiento se hizo lenta. De la altura de caída dependía también la extensión en horizontal del arrollamiento, de modo que, para una caída larga, el chorro se extendía hacia los lados sólo unos pocos milímetros y, para una caída corta, se extendía hasta un centímetro aproximadamente.

Repetí los ensayos con el acuario parcialmente lleno de agua del grifo. Así, el jarabe de maíz caía primero a través de aire y luego de agua. La caída, relativamente alta, condicionaba un arrollamiento bastante rápido, aunque



Diferencias entre los arrollamientos de un chorro grueso y uno fino

menos que cuando el fluido atravesaba sólo aire desde la misma altura. En el charco de fructosa, el cono quedaba considerablemente menos definido porque el arrollamiento era más errático.

Disolviendo sal en ella aumenté la densidad específica del agua. La aceleración del chorro sería entonces inferior a la que tendría en agua del grifo. Tras dejar reposando el agua salada durante un buen rato repetí los experimentos, con el resultado de que la frecuencia de arrollamiento era inferior que en agua del grifo y de que, como antes, la formación del cono no quedaba bien definida.

Iluminando intensamente por detrás la zona de impacto, pude observar la circulación de agua salada generada por el arrollamiento. De éste emanaban vórtices que arremolinaban el agua, separándola del cono, para luego ascender y retornar hacia el chorro de jarabe descendente.

Cuando mediaba una distancia considerable entre el vaso y la superficie del agua, la fructosa caía a ráfagas desde el vaso. El extremo inferior de cada ráfaga era una gota gruesa de fluido, seguida de un chorro más delgado que acababa desgajándose del orificio. Al entrar en el agua, el chorro formaba figuras muy complicadas. Las gota chocaba primero con el fondo y enviaba una sacudida a través del chorro; éste se alargaba, retorcía y giraba, e incluso a veces rebotaba en el charco de jarabe; poco después, remitía la velocidad del chorro y se fusionaba con el charco.

En otro tipo de ensayo, vertí una capa de aceite para transmisiones sobre agua salada. Derramé el jarabe de maíz en el acuario, atravesando en su caída el aire y luego el aceite, del que arrastró consigo parte. Al descender por el agua, el chorro presentaba un diámetro mucho mayor, inducido por el aceite que se le había adherido y, al llegar al fondo, se arrollaba con parsimonia.

El aceite para transmisiones es menos denso que el agua salada. De ahí que la aceleración descendente del chorro fuera menor que cuando el extracto de maíz caía sólo a través de agua. En ciertos instantes, la aceleración parecía ser nula e incluso negativa (ascendente). Siempre que en el chorro quedaban atrapadas burbujas de aire me era posible seguir el movimiento de las distintas porciones del fluido. Generalmente, las burbujas se movían hacia abajo, pero a veces dos zonas del chorro contiguas cursaban en sentidos contrarios y hubo alguna ocasión en que el chorro cesaba de arrollarse y se rompía; tras lo cual, su extremo inferior se elevaba para retornar a la capa de aceite para transmisiones.

¿Por qué no crear un rollo de fluido invertido? Llené el acuario con agua del grifo, sumergí una botella de plástico estrujable llena de un lubricante para motores muy viscoso. Como éste era menos denso que el agua, se elevaba cuando lo hacía salir al estrujar la botella. Supuse que, cuando se hubiese formado una capa de lubricante sobre el agua, el chorro ascendente del mismo se arrollaría al llegar a ella. En este caso, la fuerza impulsora sería el empuje de Arquímedes actuante sobre el chorro. Pero no hubo arrollamiento, o apenas se insinuó, debido, me imagino, a que el chorro ascendente ganaba velocidad con demasiada lentitud, y así, al llegar a la capa, su velocidad era aún suficientemente reducida para que se fusionara con la capa sin la compresión que necesita el efecto de pandeo. Pudiera ser que, si el depósito de agua hubiera sido más profundo y el chorro hubiera llegado a la capa de lubricante con mayor velocidad, mi intención de crear un arrollamiento invertido se habría cumplido.

Cuando de la botella estrujable salía una gota de lubricante, ésta se elevaba hasta la capa y allí permanecía durante unos 10 segundos. El retraso obedecía a que, una vez que la gota llegaba a la capa, entre ambas quedaba una película de agua, que debía expulsarse antes de que la gota pudiera fusionarse con la capa de lubricante. Las viscosidades del lubricante contenido en la superficie de la gota y del lubricante de la capa obstaculizaban el movimiento del agua, pero ésta acababa escapando y la gota desaparecía en la capa de lubricante.

Pero sí conseguí el arrollamiento invertido con pegamento. Sumergí un pequeño envase con pegamento e hice que fluyera un chorro fino hacia la superficie del agua; entonces, tan pronto como en la superficie del agua se formaba una pequeña zona de pegamento, el chorro ascendente de éste comenzaba a arrollarse. Ajustando la profundidad del envase, podía regular la frecuencia de arrollamiento. (Por cierto, que ese ensayo resultó una auténtica porquería, pues uno acaba con toda la mano y el brazo untados de pegamento.)

Seguí ensayando nuevos experimentos. En otro caso hice que un chorro de jarabe de maíz cayera atravesando una capa de amoniaco diluido (azulete con detergente para ventanas) y luego una capa de glicerina. Estos líquidos los puse en una cubeta grande. (Me estaba resultando demasiado caro tener que llenar el acuario.) Ajustando la altura correctamente, se veía cómo un chorro fino de fructosa se deshacía en grandes rollos, muy bellos, cuando entraba en la glicerina. Estos no eran tersos, ni paralelos los planos de los rollos sucesivos.

Durante varios días dejé aquel ensayo en el mismo sitio. A mi retorno, en la cubeta se distinguían claramente cuatro capas diferentes. Encima de todo se encontraba el líquido azul (del que se había evaporado el amoniaco). Venía luego una capa gris, debajo otra capa de glicerina bastante clara y, por último, una capa de glicerina con una sombra de glucosa (o quizá teñida por el azúcar). Repetí mi primer ensayo y decidí entonces introducir el vaso de papel con el jarabe de maíz hasta la capa superior de líquido teñido. Al penetrar en la glicerina, disminuyó la frecuencia del arrollamiento del chorro porque había adquirido para entonces un grosor mayor.

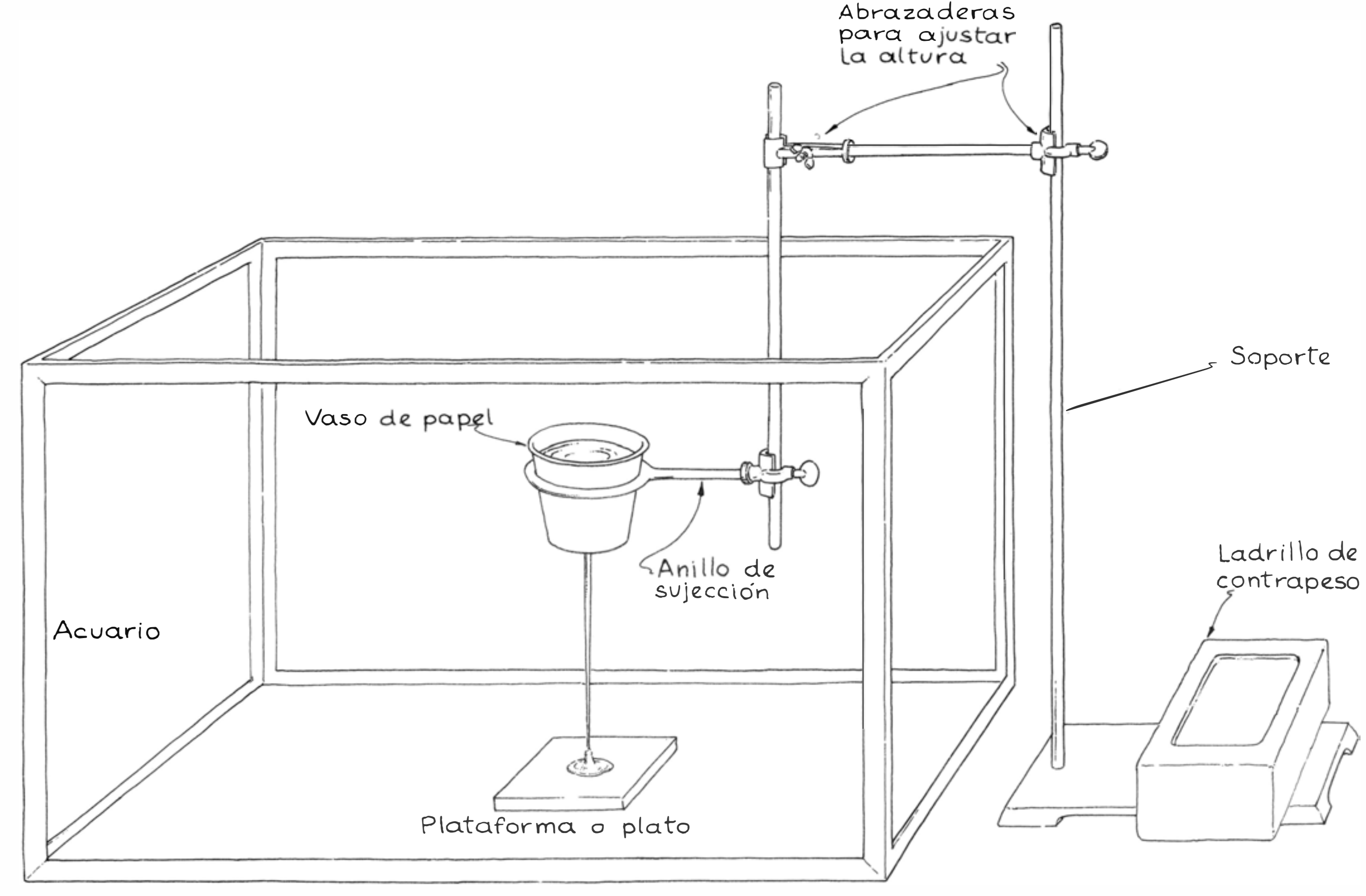
Cuando introduje aún más el vaso dentro del fluido, la presión del fluido contenido en la cubeta impidió que del vaso saliera fructosa. Volví a elevar el vaso sobre el fluido. Mientras estuvo parcialmente sumergido, había entrado algo del fluido azul, disminuyendo la viscosidad del jarabe. Entonces, el chorro se arrollaba dos veces, una encima de la capa azul y, de nuevo, al penetrar en la zona de glicerina transparente. El primer arrollamiento era rápido y producía un pequeño cono; el segundo, mucho más lento, no formaba cono.

La mayoría de los fluidos que utilicé en mis investigaciones pertenecen al tipo conocido como newtonianos, cuya viscosidad sólo puede alterarse variando su temperatura. Si ésta aumenta, la viscosidad disminuye. Para observar el efecto de la temperatura calenté jarabe de maíz y lo dejé caer en el aire. Al ser menor la viscosidad, el chorro se fusionaba más rápidamente con el charco. Al ser menor la compresión, el chorro pandeaba menos. Tras varios intentos, la fructosa estaba tan caliente y su viscosidad tan baja que el chorro no pandeaba nada y desapareció el arrollamiento.

La babaza y la masilla son dos productos para juegos que se hacen de fluidos, cuya elevada viscosidad induce a muchos a considerarlos sólidos. Para observar si un chorro de masilla se arrolla, formé un rollo fino de ese material y dispuse parte del mismo colgando por el borde de una mesa baja. El cabo que colgaba descendió lentamente hacia el suelo; cuando el extremo inferior tocó el suelo, el chorro comenzó a enrollarse en unos bucles amplios y atractivos. Introduje luego un poco de babaza en un vaso de papel de la forma acostumbrada para crear un chorro descendente; la babaza surgió por el orificio del vaso para descender después hasta el tablero de una mesa, donde, a su vez, comenzó a arrollarse.

Estos dos fluidos son del tipo llamado no newtoniano; aquí, la viscosidad no sólo depende de la temperatura, sino también de su tensión interna. La viscosidad de la babaza y de la masilla crece cuando se comprimen, pero las compresiones que se desarrollaron en los flujos graduales que creé no es probable que acrecentaran demasiado la viscosidad. El efecto de la compresión sobre un fluido no newtoniano es más evidente en una mezcla de fécula (almidón de maíz) y agua. Cuando se añade fécula al agua en cantidad suficiente para conseguir un fluido algo espeso, éste se comporta de un modo sensiblemente no newtoniano. (En enero de 1979 traté aquí de la extraña conducta de esa mezcla.)

Para experimentar con ella, preparé una mezcla espesa de fécula y agua y la vertí en el vaso de papel, al objeto de crear un chorro delgado que descendiese sobre una cubeta. Ajustando convenientemente la altura de caída, el chorro llegaba al líquido de la cubeta con una celeridad que le impedía fusionarse con él. En la parte inferior del chorro, la compresión aumentaba la viscosidad, haciéndola superior a la existente en la zona más alta; el chorro se fusionaba más lentamente que un fluido newtoniano comparable. El chorro no se arrollaba circularmente, sino que oscilaba de

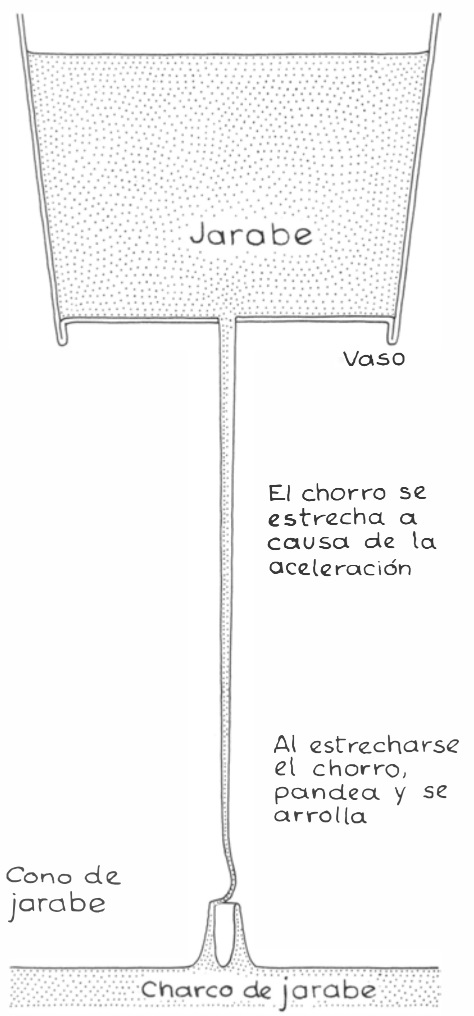


Montaje para observar chorros de fluidos viscosos

un lado a otro y, de vez en cuando, el plano de oscilación variaba de orientación.

Desconozco qué determina la orientación de ese plano, ni puedo explicar por qué no se generan rollos circulares. Me atrevo a aventurar que la compresión hace que el chorro pandee lateralmente, además de incrementar la viscosidad en exceso como para que la mezcla pandee de modo que describa una trayectoria circular en torno al eje central; entonces, la única posibilidad es que oscile en vaivén como una cinta que se pliegue.

En una cubeta puse una mezcla espesa de fécula y agua, seguida de una capa de aceite de maíz de un centímetro de profundidad, aproximadamente. Del vaso de papel caía un chorro de glucosa que, al entrar en el aceite, se separaba en forma de bellos rollos. Estos chorros, empero, no descendían en línea recta, sino que la sucesión de ellos se arrollaba, a su vez, al aproximarse a la fécula. Los rollos pequeños los originaba el paso del chorro desde el aire hasta el aceite; el arrollamiento de éstos probablemente se debiera al impacto que sufrían en la capa de fécula.



Pandeo de un chorro viscoso

Los resultados que obtuve con catsup, otro fluido no newtoniano, presentaban motivos para la sorpresa. El chorro de salsa sólo se arrollaba si la altura estaba comprendida entre dos y cinco centímetros y el arrollamiento creaba una gran elevación que se fundía lentamente con el charco. Cabía esperar que, aumentando la altura del vaso, se acelerara la velocidad de arrollamiento y que, luego, apareciese un chorro que se desintegrase antes de llegar al charco. Pero, en vez de ello, me encontré con que el arrollamiento era sustituido por un cráter en la cima de la elevación; además, el chorro seguía siendo continuo.

El catsup es un tipo de fluido no newtoniano cuya viscosidad decrece cuando se le comprime. Si el chorro caía desde bastante altura, su velocidad era elevada en la proximidad del charco; entonces, la compresión producida por el choque disminuía manifiestamente la viscosidad de la salsa en la porción inferior del chorro y en la protuberancia circundante, con el resultado de que el chorro era capaz de excavar un cráter. Ahora bien, en cuanto la salsa fluía separándose del lugar del impacto, su viscosidad aumentaba y la corriente aminoraba de velocidad, manteniéndose la elevación circundante.

También estudié de qué modo un charco, no quieto, podía afectar el arrollamiento de un fluido viscoso. Imaginé que, si el charco giraba, se alteraría el arrollamiento del chorro. Así pues, monté una bandeja de pastelería sobre un giradiscos barato, asegurándola con cinta al plato giratorio; coloqué luego un vaso de papel por encima del plato giratorio. Cuando el jarabe procedente del vaso comenzó a fluir sobre la bandeja, puse en marcha el giradiscos. Tras algunos intentos, conseguí que la bandeja girase en sentido contrario al de arrollamiento del jarabe. Dado que el control que podía ejercer sobre la velocidad del plato era escaso, la frecuencia de arrollamiento la hacía variar ajustando la altura del vaso. Al igualarse dicha frecuencia a la de rotación de la bandeja, cesó el arrollamiento. El chorro seguía pandeando inmediatamente antes del charco de jarabe, pero su forma permanecía constante. Este resultado pone de manifiesto lo señalado por Barnes en el sentido de que las partículas no describen hélices en torno al eje geométrico del chorro.

Entre otros muchos casos de arrollamiento y plegamiento de chorros viscosos, probablemente el más interesante se dé en la preparación de espuma de huevo para repostería. La espuma de huevo se prepara a partir de una mezcla de yemas y azúcar, que se bate al objeto de aligerarla con burbujas de aire. El azúcar absorbe agua de las yemas, haciendo que la mezcla sea como un jarabe y aumente su viscosidad. Si la mezcla no se bate lo suficiente, las yemas no se desnaturalizan lo necesario (o sea, sus proteínas no se desenredan del todo), ni se dispersan bien en la mezcla; entonces, el producto es un pastel que sabe a huevo cocido. Si se bate más de la cuenta, las yemas se desnaturalizan demasiado y las burbujas de aire adquieren un volumen excesivo, con lo que el pastel dará la sensación de algodón de azúcar.

Los buenos cocineros conocen una prueba sencilla para saber el punto exacto de un batido perfecto. Se trata de separar, de vez en cuando, la paleta de batir de la mezcla, para que regrese al cuenco un chorro de fluido. Cuando éste se arrolle, o se pliegue en vaivén como una cinta, es que el batido ha terminado.

En junio les hablé del resalto hidráulico, u onda de choque que se forma cuando una corriente de fluido pasa de supercrítica a subcrítica. Wallace B. Riley, de San Francisco, me ha escrito a propósito del resalto hidráulico que se emplea para soldar tarjetas de circuito. Sobre la cara anterior de las tarjetas se montan transistores, circuitos integrados y otros componentes electrónicos, hincando sus terminales en orificios hasta sobresalir por la cara posterior, donde están grabados químicamente los ramales de interconexión metálicos. Inicialmente, los terminales se doblan para mantenerlos en posición.

Para soldar los terminales a los ramales de interconexión, se hacen pasar las tarjetas por una "soldadora ondular", que consiste en un canal inclinado por el que discurre, pendiente abajo, una corriente de soldadura derretida. Cerca del fin del canal hay un obstáculo que crea un resalto de soldadura estacionario y que trasciende el canal un poco más que el resto de la soldadura descendente. Al tiempo que una cinta de arrastre las transporta canal abajo, las tarjetas de circuito se precaldean merced a la radiación térmica de la soldadura caliente y, al pasar por encima del resalto, sus caras posteriores quedan bañadas de soldadura. Cuando una tarjeta abandona el canal, la soldadura cae por gravedad, a salvo de terminales y ramales de interconexión, y se enfría; así, terminales y ramales quedan soldados entre sí permanentemente.

Libros

Gödel entero, endocrinología, revolución newtoniana y transiciones de fase y fenómenos cooperativos

J. F. Prida, E. Herrera, M. Artigas y M. G. Velarde

OBRAS COMPLETAS DE KURT GÖDEL. Ed. Alianza Universidad; Madrid, 1981. Prólogo, introducciones y traducción de Jesús Mosterín. Por primera vez se presenta reunida en un solo volumen toda la obra de Kurt Gödel, publicada en alemán e inglés entre 1930 y 1974 en actas y revistas de diversos países.

No es intención del recensor hacer una valoración de las aportaciones científicas de Kurt Gödel, no sólo uno de los más grandes matemáticos de todos los tiempos, sino también uno de los más profundos pensadores. Baste indicar al lector no especialista que en el campo que principalmente cultivó —la lógica simbólica y la filosofía de la matemática— los resultados encontrados por Gödel y las técnicas inventadas para obtenerlos supusieron tal revolución, que resulta natural dividir la historia de esas ciencias en dos grandes eras: antes de Gödel y a partir de Gödel.

Su primera gran aportación a la lógica simbólica la encontramos en "La suficiencia de los axiomas del cálculo lógico de primer orden", presentada a los 23 años como tesis doctoral en la Universidad de Viena. En ella prueba que las reglas de deducción del cálculo de Hilbert-Ackermann son suficientes para derivar todas las consecuencias de cualquier conjunto de fórmulas del lenguaje de primer orden, en el que puede formalizarse la teoría de conjuntos y, por tanto, toda la matemática conocida hasta el momento.

Como consecuencia inmediata del teorema de completitud, un conjunto de fórmulas es satisfactible si y sólo si lo son todos sus subconjuntos finitos, resultado que constituye el punto de partida de la teoría de modelos, que investiga estructuras algebraicas con ayuda de lenguajes formales. Otra consecuencia de la prueba que da Gödel del teorema de completitud es que todo conjunto de fórmulas de primer orden que posea un modelo, posee también un modelo numerable, resultado ya probado con anterioridad por Skolem, fortaleciendo un teorema de Löwenheim.

Poco después de probar la completitud de la lógica de primer orden, Gödel demostró que la lógica de segundo orden es incompleta. Esta lógica se basa en un lenguaje de gran capacidad de expresión, en el que pueden ser caracterizadas ciertas clases de estructuras que no pueden ser completamente descritas en un lenguaje de primer orden. Una consecuencia de la enorme capacidad de expresión de este lenguaje es que en él no se verifican ni el teorema de Löwenheim-Skolem, ni el de finitud (o compacticidad), ni, en consecuencia, el de completitud.

En 1931 Gödel publicó el más famoso de sus trabajos: "Sobre sentencias indecidibles en los Principia Mathematica y sistemas afines". Entre los resultados que allí se presentan se encuentran dos de los más notables teoremas de toda la historia de la lógica matemática. Como dice Mosterín, a partir de entonces "ni la lógica ni la filosofía de la matemática volverían a ser lo que fueron. Una cierta ingenuidad y un cierto optimismo habían desaparecido para siempre". Este artículo, que echó por tierra, por irrealizable, el programa de Hilbert relativo a la fundamentación de la matemática, no sólo es notabilísimo por los nuevos resultados que presenta y que en su tiempo causaron extraordinario asombro a los poquísimos que los entendieron, sino también por las originalísimas técnicas inventadas para obtenerlos, que cambiaron el rumbo de las investigaciones lógicas.

En primer lugar se aritmetiza una parte considerable de la metaaritmética, haciéndose corresponder relaciones entre números naturales a ciertas proposiciones relativas a la demostrabilidad en el sistema formal aritmético de los Principia Mathematica. A continuación se prueba que muchas de esas relaciones son recursivas primitivas y que en consecuencia (y esa es la clave de todos los resultados) son representables en el sistema formal. Luego Gödel construye mediante diagonalización la famosa fórmula aritmética que corresponde a la proposición metaaritmética de que ella misma es indemostrable. Finalmente prueba que bajo la hipótesis de la consistencia del sistema esa fórmula es indemostrable y que bajo la más fuerte suposición de la ω-consistencia también es indemostrable su negación. Es pues indecible dentro del sistema. Sin embargo, existe para ella un método de decisión metaaritmético: puesto que la fórmula en cuestión afirma su propia indemostrabilidad y es efectivamente indemostrable (siempre bajo la hipótesis de que el sistema es consistente), se trata de una fórmula verdadera. Formalizando dentro del sistema la prueba de que si dicho sistema es consistente, entonces la fórmula autorreferente es indemostrable, Gödel obtiene con toda facilidad que una prueba de la consistencia del sistema aritmético no puede ser formalizada dentro del mismo, a menos, naturalmente, que sea inconsistente.

Este teorema es obviamente válido en la teoría de conjuntos (en la que a su vez puede representarse la aritmética formal). Y puesto que en la teoría de conjuntos puede formalizarse toda la matemática, el teorema de Gödel puede interpretarse en el sentido de que no existe una prueba matemática de la consistencia de la matemática.

En el mismo artículo de 1931 Gödel hace otra trascendental aportación a la lógica con la definición de la clase de las funciones recursivas generales, que ampliaba la de las funciones recursivas primitivas, ya estudiadas por Dedekind. La noción de función recursiva general es hoy universalmente aceptada como la contrapartida formal de la noción intuitiva de función calculable algorítmicamente y está en la base de la teoría de la computabilidad, "el corazón de la lógica" en palabras de Sacks.

Una versión más fuerte del teorema de Gödel fue dada en 1936 por Rosser, que utilizando una fórmula autorreferente más compleja, sustituyó la hipótesis de la ω-consistencia por la de la simple consistencia. Una prueba de la consistencia de la aritmética formal, por supuesto no formalizable dentro del sistema, fue dada por Genzen en 1938 utilizando inducción transfinita.

El último de los grandes resultados de Gödel fue publicado en 1938 en el artículo "La consistencia del axioma de elección y de la hipótesis generalizada del continuo". Allí se aborda el problema, sugerido por Cantor, de si de los axiomas de la teoría de conjuntos, incluido el de elección, puede derivarse o refutarse la proposición que niega la existencia de conjuntos de cardinal mayor que el de los números naturales y menor que el de los reales. La generalización del problema es la pregunta de si en la teoría de conjuntos se puede probar o refutar la igualdad $2^{\chi_\alpha} = \chi_{\alpha+1}$ donde α es un ordinal cualquiera. Gödel excluyó la segun-

da posibilidad, construyendo un modelo de los axiomas de la teoría de conjuntos en el que la hipótesis del continuo es verdadera. Veinticinco años más tarde, Paul Cohen excluiría también la primera posibilidad, con lo que la hipótesis del continuo resulta ser una proposición indecidible.

De nuevo en ambos casos, al valor del resultado obtenido hay que añadir el de la técnica inventada para demostrarlo: la definición de la clase de los conjuntos constructibles en el caso de Gödel, el "forcing" en el de Cohen.

Terminaremos señalando que en la segunda parte de su vida Gödel se ocupó preferentemente de problemas filosóficos y físicos, haciendo alguna notable aportación a la teoría de la relatividad generalizada.

Las introducciones de Mosterín son excelentes, particularmente las relativas a los trabajos de Gödel sobre lógica y teoría de conjuntos. La considerable aportación de datos históricos ayuda a comprender la génesis y desarrollo de los problemas que Gödel aborda. Únicamente señalaremos cuatro inexactitudes: La definición de "teoría formalizada" que aparece en la página 46 sería mejor sustituirla por "conjunto de fórmulas cerrado bajo derivabilidad", que incluye las teorías no axiomatizables; en la página 48 se afirma que en Gödel (1931) se introducen por primera vez las funciones recursivas primitivas, en vez de las funciones recursivas generales, que sería lo correcto; en la página 49 se dice que la gödelización es biunívoca, siendo obvio que no todo número natural corresponde a una fórmula o a una sucesión; en la página 128 se afirma que "la clase de todas las fórmulas prenexas con tres cuantificadores universales seguidos constituye un tipo de reducción", lo que entendido literalmente no es cierto, ya que la clase $\exists^{\infty}\forall^{\infty}$ es decidible, como probaron Bernays y Schönfinkel en 1928. Lo que se demuestra en Gödel (1933) es que la clase $\forall^{3}\exists^{\infty}$ es un tipo de reducción (y en 1943 probaría Suranyi que incluso lo es la clase $\forall^{3}\exists$).

En cuanto a la traducción, que también calificamos de muy buena, únicamente objetamos la elección de los términos "satisfacibilidad", "compacidad" y "completud", cuando a nuestro juicio hubiera sido mucho más estético haber escogido en su lugar "satisfactibilidad", "compacticidad" y "completitud".

Dada la dispersión de los trabajos de Gödel, la presente obra será de la mayor utilidad para cuantos se interesan por la lógica, la matemática y sus fundamentos, la filosofía de la ciencia e incluso la epistemología, aun cuando la lectura de los artículos de Gödel es muy ardua, requiriéndose para su comprensión profunda un considerable grado de especialización. (J.F.P.)

MANUAL DE ENDOCRINOLOGÍA, por J. Hazard y L. Perlemuter. Ed. Toray-Masson, S.A.; Barcelona, 1981; 510 páginas. El sistema endocrino constituye un factor clave del equilibrio homeostático en un individuo, es decir, del mantenimiento de la constancia del medio interno. Esta visión de la endocrinología se presenta totalmente desvirtuada cuando uno termina de leer esta obra, dando la sensación de que nuestro organismo llega a mantener el estado estacionario de su medio interno "a pesar de la existencia de las hormonas y las glándulas que las sintetizan y segregan" y no, como es la realidad, gracias a su presencia, en coordinación con otros sistemas. Realmente esa visión desvirtuada de la endocrinología está patente tanto en el contenido como en la forma de esta obra, la cual dista mucho de ser lo que sus autores nos prometen en el preámbulo. La desproporción se manifiesta simplemente en el volumen comparativo de los distintos capítulos, existiendo alguno, como el dedicado al "Hipotálamo y las regulaciones hormonales" (capítulo 2.º), con cuatro páginas, y otros, como el dedicado a la diabetes (capítulos 6º y 7º), con más de cien páginas.

Esta desproporción en las distintas partes de la obra no tendría tanta importancia si, al menos, se trataran los temas más fundamentales de la disciplina con cierto rigor científico y práctico, sin necesidad de hacerla más extensa, cosa que no ocurre. Ya en el primer capítulo de la obra se pone de manifiesto este problema, cuando el lector "no especialista" (al que aparentemente va dirigido) se encuentra con términos tales como "regulación *manual*" (página 7) o "importancia del *terreno*" (página 11), que, además de ser totalmente inapropiados, confunden más que clarifican al que intenta comprender las generalidades del sistema endocrino. A lo largo de todo el texto se mantiene esta confusión en la terminología, y como ejemplo patente de ello está el uso indistinto de los términos "acción" y "efecto(s)" de las hormonas, cuando está ya completamente establecido el que la acción de una hormona es la primera señal (o cambio) que produce en la célula diana y que, como resultado de esa acción, se desencadenan las respuestas celulares correspondientes que van a dar lugar a los cambios en el medio intra- y extracelular, que son los efectos. Con este criterio, no son "acciones de la ACTH" (página 23), sino efectos los que se producen tras la inyección de esta hormona, mientras que sí podría ser "acción celular" de las hormonas tiroideas la que se describe en la página 91, aunque precisamente la acción de estas hormonas no se cree que esté directamente mediada por la activación de la adenilciclasa, como se indica en dicha página.

Otro ejemplo de la confusión terminológica que se manifiesta en la obra es la referente a la síntesis de glucosa (gluconeogénesis), que se le denomina erróneamente glucogénesis (página 285), que corresponde estrictamente a la síntesis de glucógeno. En la misma página se cita también la neoglucogénesis, con lo cual el lector logra el mayor grado de confusión, pues si por ese término los autores están haciendo referencia a la síntesis "de novo" de glucógeno a partir de glucosa, esta vía metabólica no es dependiente de la actividad de las transaminasas, como, sin embargo, se indica en el texto. Para colmo, en el mismo párrafo, se hace referencia a la transformación de los "aminoácidos glucoformadores en ácidos γ-cetónicos", dando como explicación adicional la indicación de que "así entran en el ciclo de Krebs". Por un lado, los aminoácidos glucoformadores no se transforman en γ-cetoácidos sino en α-cetoácidos, y, por otro lado, para que estos metabolitos lleguen a sintetizar glucosa, deben precisamente escaparse de entrar en el ciclo de Krebs, ya que se perderían átomos de carbono en forma de CO_2 y difícilmente podría llegar a formarse la hexosa.

Desde el punto de vista cuantitativo, la obra presta más atención a los aspectos fisiopatológicos de la endocrinología que a los básicos. A pesar de ello, también en los apartados correspondientes a la fisiopatología aparecen errores, confusión de nomenclatura y omisiones importantes. A título de ejemplo tenemos, en cuanto a errores, el que aparece en la página 204, desde donde se envía al lector a la página 153 para ampliar el tema de la diabetes "durante el embarazo", y en esta página de referencia no aparece ese tema. En cuanto a confusión de nomenclatura, en la página 258 se hace referencia a las pruebas de tolerancia oral e intravenosa a la glucosa, a las que se les denomina inapropiadamente "hiperglucemia provocada por vía oral e intravenosa". Y en cuanto a las omisiones, no se citan ni de pasada las importantes alteraciones del metabolismo lipídico que se presentan en el diabético.

Intentando dar una visión aplicada del tema, los autores incluyen un capítulo de "Dosificaciones y pruebas" (capítulo 16), el cual dista de aportar algo

positivo y práctico al lector. Por un lado, el desorden de la presentación es manifiesto; como muestra de ello está el que se describe una prueba de función tiroidea (página 471), a la que le sigue la descripción de otra serie de pruebas que nada tienen que ver con el tiroides (páginas 473 a 485), para volver de nuevo a pruebas relacionadas con el tiroides (páginas 485 y 499). Por otro lado, los apartados de este capítulo contienen numerosos errores, tanto de fondo como de forma. Este es el caso, por ejemplo, del término "la ATP" (página 454), sin que esta abreviatura se haya definido; la indicación de "la radiación gamma de I^{131} presente en el cuerpo tiroideo" (página 458), sin hacer referencia de dónde procede ese iodo; en la página 475, los autores explican el fundamento de la valoración de la glucemia en base a la formación de H_2O, cuando en realidad la acción de la glucosa-oxidasa da lugar a H_2O_2; en relación con esta determinación, en el texto aparece una de las pocas referencias bibliográficas de la obra, pero equivocada (Nuguett, en página 476, debe ser Huggett); etcétera.

Después de leer esta obra, uno se queda un poco perplejo de que le hayan dado algo muy distinto de lo que en las primeras páginas se le ofrecía. Realmente el título debería habérsele cambiado por el de "Aspectos de la fisiopatología endocrina", o algo similar. También debería haberse cambiado el preámbulo, porque lo que en él prometen los autores dista mucho de la realidad que el lector encuentra en el texto. Es especialmente difícil saber a qué personas va dirigido este manual, ya que el médico no especialista, o incluso el estudiante, va a obtener con él una mayor confusión de sus conocimientos y el especialista raramente encontrará algo de interés u original. De forma objetiva, se considera que los aspectos negativos de esta obra que hemos ido describiendo deben ser compartidos tanto por los autores como por la propia editorial, que ha hecho escasos esfuerzos por mejorarla. Es evidente que gran número de los errores deben achacarse a una falta de rigor en la corrección de las pruebas correspondientes. El índice alfabético de materias (página 505 y siguientes) es enormemente pobre y de una utilidad discutible. Como botón de muestra: en él no aparecen términos tales como "aldosterona", "embarazo", "glucosa", "tiroxina", etcétera, que serían de indudable interés para el lector. Finalmente, cabe indicar de forma subjetiva que, en vista de la falta de "manuales de endocrinología", entre los textos existentes en versión castellana, resulta triste que los esfuerzos económicos y de tiempo invertidos en la edición de éste hayan sido desperdiciados para lanzar una obra tan modesta y de escasa utilidad para el clínico, el básico o el científico. (E.H.)

THE NEWTONIAN REVOLUTION, WITH ILLUSTRATIONS OF THE TRANSFORMATION OF SCIENTIFIC IDEAS; por I. Bernard Cohen. Editado por Cambridge University Press; Cambridge-New York, 1980; 404 páginas. I. B. Cohen, doctor en historia de la ciencia por la Universidad de Harvard y profesor en esa misma Universidad, es uno de los más prestigiosos historiadores de la física, especialmente de la etapa newtoniana, sobre la que ha publicado numerosos estudios. Ha sido Presidente de la Unión Internacional de Historia y Filosofía de la Ciencia, vicepresidente de la American Association for the Advancement of Science, editor de la revista "Isis" de historia de la ciencia, y se le puede calificar, sin duda, como uno de los mejores especialistas en el pensamiento de Newton, algunas de cuyas obras ha editado y comentado. Precisamente, la obra que ahora glosaré se basa en las *Wiles Lectures* dadas por Cohen en Belfast el año 1966, y no ha sido publicada hasta 1980 porque el autor estaba ocupado en la edición crítica de la obra principal de Newton, los "Principios matemáticos de la filosofía natural". Esa edición fue publicada en 1971 y 1972, y sólo entonces pudo dedicarse Cohen a preparar el libro que nos ocupa.

En *The Newtonian Revolution,* Cohen intenta describir en qué consistió exactamente esa revolución, que fue decisiva para toda la posterior orientación de las ciencias experimentales. Para ello, utiliza con gran erudición las fuentes originales —las obras y la correspondencia de Newton, y de sus inmediatos precursores, especialmente de Kepler—. El estilo es muy claro, y se repiten deliberadamente a lo largo del libro las ideas principales, de modo que sus distintas partes pueden entenderse por separado; no obstante, para seguir el desarrollo concreto de las argumentaciones se requiere un cierto conocimiento especializado de la física, de tal modo que la obra en su conjunto va dirigida a lectores con una cierta base científica.

Cohen sostiene que lo característico de la revolución newtoniana fue lo que él llama el "estilo de Newton", que es un modo concreto de plantear y resolver los problemas de la física, y afirma que ese estilo sólo se desarrolla plenamente en los "Principia" de 1687. Por eso, el estudio de Cohen se centra sobre todo en esa obra, que el mismo Newton reeditó dos veces introduciendo diversas variantes, y de la cual, como hemos dicho, se ha publicado una edición —preparada por Cohen, junto con A. Koyré y A. Whitman— en 1972, basada en la tercera edición de Newton, que incluye las diversas variantes y una introducción de Cohen.

El "estilo de Newton" es lo que, según Cohen, le permitió abordar con éxito los problemas de la física y establecer el modo de proceder que luego han seguido los científicos posteriores. Por eso, al caracterizar la revolución newtoniana, Cohen señala lo que, bajo su punto de vista, son los rasgos básicos del método de las ciencias exactas modernas. La idea fundamental es que Newton estableció una jerarquía entre los diversos aspectos de los problemas físicos, que le permitió estudiar cada uno de ellos por separado: por una parte, los aspectos matemáticos; por otra, la aplicación de las matemáticas a los fenómenos reales; y, en tercer lugar, el estudio de las causas verdaderas de esos fenómenos.

De este modo, el "estilo de Newton" tiene tres fases. En la primera, Newton construye un sistema matemático que viene a ser una simplificación de lo que existe en la realidad, de tal manera que, en esta fase, puede concentrarse en un estudio exclusivamente matemático del sistema idealizado. En la segunda, las consecuencias matemáticas obtenidas anteriormente se refieren a los fenómenos reales, y se comparan con los resultados obtenidos mediante los experimentos científicos, para ver si están o no de acuerdo con ellos. En la tercera, y una vez que los sistemas matemáticos se han corregido y ajustado de acuerdo con los datos experimentales, Newton considera de dónde provienen los fenómenos considerados. Todavía existe una "continuación" de la tercera fase, que consiste en preguntarse por la naturaleza de las causas físicas que se han determinado: aunque Newton estuvo siempre interesado en esta cuestión y no cesó de estudiarla, sin embargo no llegó a soluciones satisfactorias, y por este motivo se abstiene frecuentemente de emitir sus opiniones sobre estos temas.

Las tres fases del "estilo de Newton" se ilustran considerando el problema del movimiento de los planetas, uno de los temas centrales de los *Principia.* Aquí sólo aludiré esquemáticamente a esa ilustración, que Cohen expone con gran amplitud. En la primera fase, Newton simplifica la cuestión y plantea el problema matemático del movimiento de un punto-masa sometido a una fuerza central (o un campo de fuerzas todas ellas dirigidas hacia un mismo punto). En la segunda fase, Newton muestra

que ese tipo de movimiento es condición necesaria y suficiente para explicar la "ley de las áreas" o segunda ley de Kepler, según la cual el radio vector que une un planeta al sol describe áreas iguales en tiempos iguales, ley que se comprueba con suficiente precisión mediante la experiencia. En la tercera fase, Newton demuestra que una gran variedad de fenómenos anteriormente considerados se explican admitiendo la existencia de la gravitación universal, que actúa según una ley matemática determinada. La existencia y expresión matemática de la ley de la gravitación, y su aplicación a los fenómenos terrestres y simultáneamente al movimiento de los planetas, fue el gran hallazgo de Newton, como es bien sabido. Pero Newton, en los *Principia,* dijo no conocer la naturaleza de esa fuerza de atracción entre los cuerpos: ésta sería la "continuación" de la tercera fase, y es un tema que siempre interesó vivamente a Newton, y sobre el cual sostuvo diversas hipótesis que no llegó a establecer con suficiente seguridad. (Cohen alude expresamente a ellas y a su valor.)

Hay que añadir que la primera y segunda fase corresponden, según Cohen, respectivamente a los libros primero y segundo de los *Principia,* y la tercera al libro tercero, que originalmente había sido redactado como un "Sistema del mundo", y que sólo posteriormente se publicó en su forma original. Además, las dos primeras fases no son "simples": el ajuste de las formulaciones matemáticas con los datos experimentales requiere que se vayan introduciendo nuevos elementos en las construcciones imaginarias (nuevas "fases uno"), de modo que dan lugar a nuevas "fases dos", y así, en realidad, se da una alternancia de fases uno y dos hasta que se llega a una formulación que corresponde correctamente a los datos de la experiencia.

Ahora puede comprenderse por qué el "estilo de Newton" tendrá tanta importancia, según Cohen, no sólo en la obra newtoniana, sino en el desarrollo de la ciencia moderna posterior. El motivo es que ese modo de abordar los problemas permite distinguir jerárquicamente tres órdenes de problemas relacionados, si bien pueden estudiarse con cierta independencia. En primer lugar, está el aspecto matemático, que, aunque se aplique a sistemas idealizados a partir de la realidad, puede desarrollarse de modo autónomo, sin otra preocupación que la corrección de las deducciones matemáticas en su propio plano. En segundo lugar, y tomando como base los anteriores desarrollos matemáticos, se encuentra el problema de la correspondencia de las construcciones teóricas con los resultados experimentales, que también admite un tratamiento específico propio. En tercer lugar, y trabajando sobre los resultados de las dos fases anteriores, la determinación de las causas físicas reales ya es un tema que pertenece a la "filosofía natural"; puede entenderse ahora mejor por qué Newton tituló su principal obra (la que es objeto central del estudio de Cohen que nos ocupa) como *Principios matemáticos de la filosofía natural,* ya que, en efecto, intentaba llegar a conclusiones sobre las verdaderas causas de los fenómenos naturales a través de la aplicación de las matemáticas al estudio de dichos fenómenos. Por último, y refiriéndonos a la gravitación universal, que Newton admite como causa real de los fenómenos que estudia en su mecánica, él declara no haber conseguido determinar su verda-

dera naturaleza, dejando abierto el ulterior problema filosófico y científico planteado por la fase tercera.

Este modo de proceder permite, en efecto, que se realicen avances reales en alguno de los aspectos mencionados, aunque existan dificultades para progresar en otros. Puede conseguirse, por ejemplo, una teoría física aceptable y útil para prever los fenómenos, aunque se desconozcan por el momento las causas reales de esos fenómenos. Y pueden determinarse dichas causas, aunque se desconozca su naturaleza más íntima. Esta distinción y jerarquía de los diversos aspectos de los problemas científicos será, según Cohen, la clave de la revolución newtoniana, y el modelo que a partir de Newton ha seguido la ciencia moderna.

Se advierte fácilmente que Cohen admite en el procedimiento científico un estadio "cuasi-positivista" (la expresión es suya), que goza de cierta independencia respecto a la determinación de la existencia y naturaleza de las causas reales de los fenómenos. Pero, con ello, no sostiene una caracterización positivista de la ciencia. Respecto a Newton, el asunto está claro: sería un monumental error histórico calificarlo como positivista (aunque a veces se haya cometido ese error), ya que Newton afirmó claramente la existencia real de la gravitación como causa de muchos fenómenos, y, aunque declaró que no había determinado su verdadera naturaleza y que por ello se abstenía de hacer "hipótesis" sobre ese tema, no cesó de estudiar la cuestión y de buscar su solución. Respecto a la ciencia en general, la tercera fase del procedimiento científico implica la realidad de las causas de los fenómenos, y la segunda fase considera la aplicación de las construcciones teóricas a los fenómenos naturales reales. El procedimiento científico, tal como queda caracterizado por Cohen, es incompatible con una visión positivista: Cohen señala claramente este punto —sin establecer polémicas— respecto a Newton, y, de modo general, el estatuto "cuasi-positivista" de las fases uno y dos solamente apunta a la posibilidad de que resulten científicamente aceptables determinadas teorías prescindiendo de la consideración explícita de su correlato real.

La primera parte de *The Newtonian Revolution* está dedicada a los temas hasta ahora expuestos. La segunda, más breve, trata acerca del modo como se efectúan las revoluciones científicas: según Cohen, no se trata de innovaciones bruscas, sino de "transformaciones" conceptuales, en las que las ideas disponibles en un determinado momento son vistas bajo un nuevo enfoque. Cohen subraya así la continuidad del desarrollo científico, y estudia en concreto cómo se realizó esa transformación de conceptos en Newton partiendo de las leyes de Kepler.

Cohen pretende y consigue hacer una historia verdadera de la ciencia real, evitando encuadrar la ciencia dentro de clichés filosóficos preconcebidos. Presenta un Newton mucho más coherente y consciente del alcance de sus afirmaciones de lo que a veces se supone: quizás incluso demasiado coherente, a costa de no aludir apenas a cuestiones como los conceptos de espacio y tiempo absolutos, que desempeñan una función importante en el sistema newtoniano. Por otra parte, la ciencia posterior se ha desarrollado efectivamente en la dirección señalada por Cohen, pero quizás acentuando excesivamente el aspecto "cuasi-positivista", por lo que sería

deseable un mayor equilibrio, que sólo puede alcanzarse aceptando la trabajosa tarea de considerar más ampliamente el sentido realista de las leyes y teorías científicas: se trata de una tarea, a veces difícil, que corresponde en primer lugar a los propios científicos, y no sólo a los filósofos, y que tiene gran importancia para el desarrollo fecundo de las ciencias y para que éstas proporcionen, tanto a nivel de especialistas como a nivel divulgativo, una imagen verdadera de la realidad. Es muy posible que la realización de esa tarea sea factible si los científicos distinguen en sus métodos y conclusiones las fases que Cohen señala en el "estilo newtoniano", y lo hacen aún con más rigor que el mismo Newton. (M.A.)

ORDER AND FLUCTUATIONS IN EQUILIBRIUM AND NONEQUILIBRIUM STATISTICAL MECHANICS. (XVIIth International Solvay Conference on Physics.) Dirigido por G. Nicolis, G. Dewel y J.W. Turner; Wiley-Interscience. New York, 1981; 374 páginas. Contiene este libro las conferencias invitadas y las muy sabrosas discusiones habidas en el 17 Conseil Solvay de Física (Noviembre, 1978). Estas reuniones "Solvay" (en honor de su patrocinador, un rico industrial belga) se celebran en Bruselas una vez cada trienio (dedicando un año a la química, otro a la física y el tercero en blanco); aunque no son ya lo que eran en la década de los treinta, cuando se reunían los grandes (y escasos) santones y padres de la ciencia (Lorentz, Einstein, los Curie, Bohr...) siguen siendo motivo de puesta al día por parte de la "élite" de la comunidad científica sobre algunos temas candentes. En el caso que nos ocupa se trata de las transiciones de fase y fenómenos cooperativos en y fuera del equilibrio termodinámico, que son procesos donde hay ordenamiento (formación de estructura tanto arquitectónica como funcional) con y a través de fluctuaciones. El tema ha estado sobre el tapete durante la última década, aunque cabe remontarse a los años cuarenta (con un trabajo seminal de Lars Onsager sobre el modelo de Ising-Lenz que abrió una muy espectacular y fructífera vía de desarrollo); en efecto, a partir de los años 70 y 71 el entendimiento de las transiciones de fase en equilibrio parece ya conseguido en lo esencial, gracias a los trabajos de Kenneth G. Wilson [véase "Problemas físicos en muchas escalas de longitud", INVESTIGACIÓN Y CIENCIA; octubre de 1979].

A la citada parte del equilibrio (ferromagnetismo, superfluidez, transición gas-líquido en el punto crítico al final de la curva de presión de vapor, etc.) le fue dedicada casi la mitad de la reunión, siendo los conferenciantes E. Brézin (Saclay, Francia), L. Pitaevsky (Moscú, Unión Soviética) y P.C. Hohenberg (Laboratorios Bell, Estados Unidos). Tras las ponencias hubo comunicaciones sobre fenómenos cooperativos en óptica cuántica (F.T. Arecchi, Italia) y otros aspectos de transiciones de fase fuera de equilibrio. Especial énfasis se puso en el problema-modelo (o paradigma) de Bénard-Rayleigh. (En el número de septiembre de 1980 de esta revista exponíamos un caso de convección natural.)

A propósito de la convección de Bénard-Rayleigh hubo una extensa comunicación sobre cuestiones experimentales por parte de E.L. Koschmieder (Austin, Estados Unidos), seguida de otras que aportaron distintos participantes en la discusión. Enlazando con la citada conferencia de Koschmieder se leyó una muy interesante comunicación de D.H. Sattinger (Minneapolis, Estados Unidos) sobre cuestiones matemáticas, haciendo analogía con problemas tratados en mecánica cuántica con teoría de grupos (la comunicación fue más allá de la problemática de la mecánica cuántica, pues el substrato, es decir, los problemas origen de la comunicación son no lineales). En relación con el tema de las transiciones con ruptura de simetría (cual es el caso de casi todas las transiciones cooperativas e incluso de las transiciones no cooperativas o de primer orden, como el paso de agua a hielo que se hace poco a poco en el sistema) hubo un críptico, aunque fundamental, comentario de P.W. Anderson (Laboratorios Bell y Universidad de Princeton, Estados Unidos) echando dudas donde muchos de los participantes creían pisar terreno seguro.

Muy interesantes fueron, asimismo, las comunicaciones de M. Suzuki (Tokyo, Japón) y R. Graham (Essen, Alemania Federal) relativas a la descripción estocástica y, a la vez, determinista de las transiciones fuera de equilibrio. Me atrevo a afirmar que el trabajo de Graham es del calibre de uno de los padres fundadores de la mecánica estadística, J.W. Gibbs: una mezcla de potente intuición y formidable estructura formal.

Por último, la perspectiva fue dada por dos conferenciantes brillantes, I. Prigogine (Universidad Libre de Bruselas y Universidad de Austin) y L. van Hove (Ginebra, CERN). En resumen, un libro necesario para cualquier físico que desee saber por donde andan algunos de los problemas mayores en la física de finales del siglo XX. Para los historiadores es uno más de los Conseil Solvay y, posiblemente, fuente de inspiración para muchos. (M.G.V.)

Bibliografía

Los lectores interesados en una mayor profundización de los temas expuestos pueden consultar los trabajos siguientes:

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

ECONOMIC MICROBIOLOGY: VOL. 1, ALCOHOLIC BEVERAGES; VOL. 2, PRIMARY PRODUCTS OF METABOLISM; VOL. 3, SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM; VOL. 4, MICROBIAL BIOMASS; VOL. 5, MICROBIAL ENZYMES AND BIOCONVERSIONS. Dirigido por Anthony H. Rose. Academic Press, 1977-80.

MICROORGANISMOS INDUSTRIALES

THE MICROBIAL WORLD. Roger Y. Stanier, Edward A. Adelberg y John L. Ingraham. Prentice-Hall, Inc., 1976.

BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS. Thomas D. Brock. Editorial Omega, 1978.

THE LIFE OF YEASTS. H. J. Phaff, M. W. Miller y E. M. Mrak. Harvard University Press, 1978.

INTRODUCTORY MYCOLOGY. Constantine J. Alexopoulos y Charles W. Mims. John Wiley & Sons, Inc., 1979.

FUNDAMENTALS OF HUMAN LYMPHOID CELL CULTURE. J. Leslie Glick. Marcel Dekker, Inc., 1980.

MICROBIOLOGY OF FOODS. John C. Ayres, J. Orvin Mundt y W. E. Sandine. W. H. Freeman and Co., 1980.

PROGRAMACION GENETICA DE MICROORGANISMOS INDUSTRIALES

THE MOLECULAR BASIS OF MUTATION. John W. Drake. Holden-Day, Inc., 1970.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL GEN. James D. Watson. Fondo Educativo Interamericano, S. A., 1978.

THE MANY FACES OF RECOMBINATION. D. A. Hopwood en *Proceedings of the Third International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*, dirigido por O. K. Sebek y A. I. Laskin. American Society for Microbiology, 1979.

PLASMIDS. P. Broda. W. H. Freeman and Company, 1979.

GENETIC ENGINEERING: PRINCIPLES AND METHODS. Dirigido por J. K. Setlow and Alexander Hollaender. Plenum Press, 1980.

FRESH APPROACHES TO ANTIBIOTIC PRODUCTION. D. A. Hopwood y K. F. Chater en *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, vol. 210, n.° 1040, págs. 313-328; 11 de agosto de 1980.

PRODUCCION MICROBIOLOGICA DE ALIMENTOS Y BEBIDAS

MICROBIAL PRODUCTS IN FOODS: SYMPOSIUM CONVENED BY K. S. KANG, en *Developments in Industrial Microbiology*, vol. 19, págs. 69-131; 1978.

MICROBIAL TECHNOLGY: VOL. 1, MICROBIAL PROCESSES; VOL. 2, FERMENTATION TECHNOLOGY. Dirigido por H. J. Peppler y D. Perlman. Academic Press, 1979.

MICROBIOLOGY OF FOOD FERMENTATIONS. C. S. Pederson. Avi Publishing Co., 1979.

PRODUCCION MICROBIOLOGICA DE FARMACOS

APPLICATIONS OF BIOCHEMICAL SYSTEMS IN ORGANIC CHEMISTRY. Dirigido por J. Bryan Jones, Charles J. Sih y D. Perlman. John Wiley & Sons, Inc., 1976.

ANTIBIOTICS AND OTHER SECONDARY METABOLITES: BIOSYNTHESIS AND PRODUCTION. Dirigido por R. Hutter, T. Leisinger, J. Nüesch y W. Wehrli. Academic Press, 1978.

PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION. R. W. Old y S. B. Primrose en *Studies in Microbiology: Vol. 2*. University of California Press, 1980.

CONTROL OF ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS. J. F. Martin y A. L. Demain en *Microbiological Reviews*, vol. 44, n.° 2, págs. 230-251; junio, 1980.

RECOMBINANT DNA. Número especial de *Science*, vol. 209, n.° 4463; 19 de septiembre de 1980.

ELABORACION MICROBIOLOGICA DE PRODUCTOS QUIMICOS

PLASMIDS OF MEDICAL, ENVIRONMENTAL AND COMMERCIAL IMPORTANCE. Dirigido por K. N. Timmis y A. Puhler. Elsevier North-Holland, Inc., 1979.

FERMENTATION: SCIENCE AND TECHNOLOGY WITH A FUTURE. Dirigido por A. I. Laskin, M. C. Flickingers y E. L. Gaden, Jr., en *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, suplemento; 1980.

IMPACTS OF APPLIED GENETICS: MICROORGANISMS, PLANTS AND ANIMALS. Office of Technology Assessment. U.S. Government Printing Office, 1981.

TRENDS IN THE BIOLOGY OF FERMENTATION FOR FUELS AND CHEMICALS. Dirigido por A. Hollaender, R. Rabson, P. Rogers, A. San Pietro, R. Valentine y R. Wolfe. Plenum Press, 1981.

METODOS DE PRODUCCION EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRINCIPLES OF MICROBE AND CELL CULTIVATION. S. John Pirt. John Wiley & Sons, Inc., 1975.

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY. Brinton M. Miller y Warren Litsky. MacGraw-Hill Book Company, 1976.

FERMENTATION AND ENZYME TECHNOLOGY. Dirigido por Daniel I.-C. Wang, C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey y M. D. Lilly. John Wiley & Sons, Inc., 1979.

MICROBIOLOGIA AGRICOLA

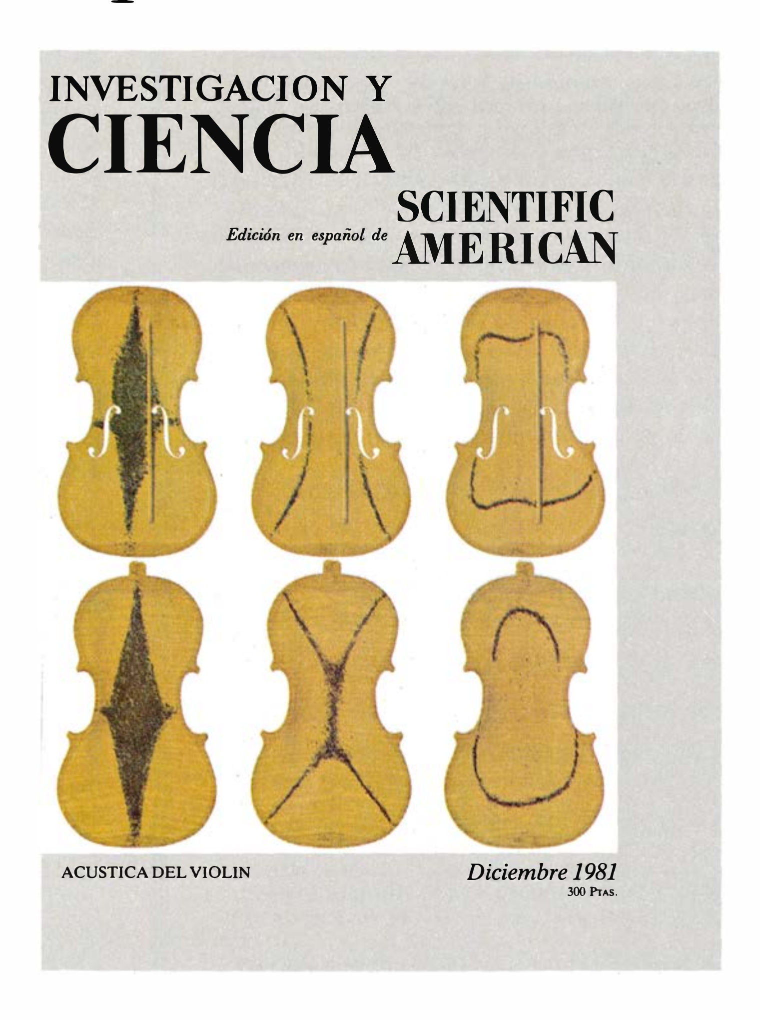
NITROGEN FIXATION: BASIC TO APPLIED. Winston J. Brill en *American Scientist*, vol. 67, n.° 4, págs. 458-466; julio-agosto, 1979.

GENETIC IMPROVEMENT OF CROPS. Dirigido por Irwin Rubenstein, Burle Gengenbach, Ronald L. Phillips y C. Edward Green. University of Minnesota Press, 1980.

GENOME ORGANIZATION AND EXPRESSION IN PLANTS, 1979. NATO Advanced Study Institute on Genome Organization and Expression in Plants. Dirigido por C. J. Leaver. Plenum Press, 1980.

PERSPECTIVES IN PLANT CELL AND TISSUE CULTURE. Dirigido por Indra K. Vasil. Academic Press, 1980.

Seguiremos explorando los campos del conocimiento



EL ODOMETRO DE VITRUBIO, por André Wegener Sleeswyk
El ingeniero romano descubrió una máquina, que tal vez no había visto, destinada a medir distancias recorridas. El artilugio dejó perplejo a Leonardo 1500 años más tarde. Fue, quizás, inventado por Arquímedes durante la primera guerra púnica.

ONDAS GRAVITACIONALES DE UN PULSAR ORBITANTE, por Joel M. Weisberg, Joseph H. Taylor y Lee A. Fowler
La predicción efectuada por Einstein en 1915 de que una masa en aceleración irradia energía en forma de ondas gravitacionales encuentra ahora apoyo experimental en la órbita de un púlsar alrededor de una estrella acompañante.

PROCESAMIENTO DE IMAGENES POR ORDENADOR, por T. M. Cannon y B. R. Hunt
Cuando la información que encierra una imagen se expresa en forma digital, dicha información puede manipularse matemáticamente en lugar de por medios ópticos. En algunos casos, utilizando estos métodos, a partir de una fotografía borrosa se pueden obtener imágenes nítidas.

UN PRIMITIVO HABITAT DE VIDA, por David I. Groves, John S. R. Dunlop y Roger Buick
Es posible que ciertos microorganismos medraran en médanos fangosos de marea hace 3500 millones de años. El ambiente puede reconstruirse a partir de depósitos sedimentarios australianos, pero no hay pruebas de existencia de vida.

HIPOCRATES, por Josep Alsina
Estudio del paso de la medicina credencial a la medicina racional en Grecia. Análisis del contenido de los escritos del llamado "Corpus" hipocrático.

LOGICA CUANTICA, por R. I. G. Hughes
En la teoría cuántica no vigen los esquemas clásicos de inferencia. Unas estructuras matemáticas, llamadas retículos, pueden modelar funciones alternativas para las palabras "y" y "o" que configurarían el mundo con algo más de coherencia.

NEUROPEPTIDOS, por Floyd E. Bloom
Se trata de breves cadenas de aminoácidos que actúan en el sistema nervioso. En ciertos casos transmiten señales entre células nerviosas, aunque también ejercen una función hormonal.

ACUSTICA DE LAS TAPAS DEL VIOLIN, por Carleen Maley Hutchins
Los modernos ensayos de las propiedades vibratorias de las tapas superior e inferior de un violín sin ensamblar revelan algo de lo que los luthiers hacen "de oído" para conseguir buenos ejemplares.



INHIBIDORES DE BIOSINTESIS DE PROTEINAS

UPTAKE AND BINDING OF CHLORAMPHENICOL BY SENSITIVE AND RESISTANT ORGANISMS. D. Vázquez en *Nature*, vol. 203, págs. 257-260; 1964.

INHIBITORS OF PROTEIN BIOSYNTHESIS. D. Vázquez. Springer Verlag, Berlín-Heidelberg-Nueva York, 1979.

PEPTIDE CHAIN TERMINATION. C. Th. Caskey en *Trends Biochem. Sci.*, vol. 5, págs. 234-237, 1980.

THE ELONGATION STEP OF PROTEIN BIOSYNTHESIS. Brian Clark en *Trends Biochem. Sci.*, vol. 5, págs. 207-210, 1980.

RIBOSOMES. STRUCTURE, FUNCTION AND GENETICS. Dirigido por G. Chambliss, G. R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan y M. Nomura. University Press, Baltimore, 1980.

THE INITIATION OF PROTEIN SYNTHESIS. Tim Hunt en *Trends Biochem. Sci.*, vol. 5, págs. 178-181, 1980.

BASES MOLECULARES DE LA ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS. D. Vázquez en *Genética Molecular Bacteriana*, págs. 367-419. Dirigido por A. Jiménez-Sánchez y R. Guerrero. Ed. Reverté, 1981.

TEMAS METAMAGICOS

HOW CAN MERLIN UNDERSTAND? Allen Newell y James A. Moore en *Knowledge and Cognition*, dirigido por Lee W. Gregg. Halsted Press, 1974.

THE PSYCHOLOGY OF COMPUTER VISION. Dirigido por Patrick Henry Winston. McGraw-Hill Book Company, 1975.

THE STRUCTURE OF ANALOGICAL MODELS IN SCIENCE. Dedre Gentner. Technical Report No 4451, Bolt Beranek & Newman, julio, 1980.

LANGUAGE AND MEMORY. Roger C. Schank en *Cognitive Science*, vol. 4, n.º 3, julio-septiembre, 1980.

TALLER Y LABORATORIO

LIQUID ROPE-COIL EFFECT. George Barnes y Richard Woodcock en *American Journal of Physics*, vol. 26, n.º 4, págs. 205-209; abril, 1958.

HEIGHT OF FALL *VERSUS* FREQUENCY IN LIQUID ROPE-COIL EFFECT. George Barnes y James MacKenzie en *American Journal of Physics*, vol. 27, n.º 2, págs. 112-115; febrero, 1959.

INSTABILITY OF JETS, THREADS, AND SHEETS OF VISCOUS FLUID. Geoffrey Ingram Taylor en *Scientific Papers of Sir Geoffrey Ingram Taylor*, dirigido por G. K. Batchelor. Cambridge University Press, 1971.